

Інститут біології клітини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АНДРЕЄВА ЮЛІЯ АНДРІЇВНА

УДК 576.343:582.282.232

ДИСЕРТАЦІЯ
МЕХАНІЗМИ ДІЇ НОВИХ РЕГУЛЯТОРНИХ ФАКТОРІВ
СИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ У ФЛАВІНОГЕННИХ
ДРІЖДЖІВ

09 – Біологія

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Андрєєва Ю. А.

Науковий керівник: Сибірний Андрій Андрійович, доктор біологічних наук, професор

Львів – 2022

АНОТАЦІЯ

Андреева Ю. А. Механізми дії нових регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2022.

Дисертаційна робота висвітлює підходи метаболічної інженерії задля виявлення нових закономірностей у регулюванні біосинтезу рибофлавіну флавіногенними дріжджами *Candida famata* та подальшого застосування цих знань з метою створення стабільних суперпродуцентів цієї сполуки.

Рибофлавін (вітамін B₂, або лактофлавін) відіграє важливу роль у метаболізмі живих організмів. Насамперед, ця сполука є попередником флавінових кофакторів флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД). Як ФМН, так і ФАД відіграють ключову роль в енергетичному метаболізмі і необхідні для функціонування численних окисно-відновних реакцій у всіх аеробних форм життя (Suwannasom et al., 2020). Рибофлавін активує фагоцитоз нейтрофілами і макрофагами, а також стимулює розмноження нейтрофілів і моноцитів (Araki et al., 1995). Зниження концентрації вітаміну B₂ призводить до зменшення швидкості проліферації клітин (Mazur-Bialy et al., 2013). Дефіцит вітаміну B₂ може призвести до запальних захворювань, таких як інфекційні запалення шкіри, хейліти, глосит (Powers, 2003), сепсису (Toyosawa et al., 2004a; Toyosawa et al., 2004b), катаракти та мігрені.

Незважаючи на значну важливість цього компонента для коректного функціонування метаболічних шляхів, організми людини і тварин не здатні продукувати власний рибофлавін. Джерелом цього вітаміну є продукти харчування. Проте не завжди дієта сучасної людини є збалансованою. Сучасний ринок рибофлавіну спрямований на забезпечення фармацевтичних

потреб, виробництва харчових додатків для людей, виробництва напоїв (вітамін В₂ додають у якості натурального пігменту яскраво-жовтого кольору), медична галузь та виробництво кормів для тваринництва з додаванням рибофлавіну. Мікробіологічний синтез, що має ряд переваг у порівнянні з хімічним синтезом, зараз відповідає за усю промислову продукцію рибофлавіну.

У промисловій продукції рибофлавіну використовували спеціально сконструйовані штами бактерій *Bacillus subtilis*, цвілевих грибів *Ashbya gossypii* і дріжджів *C. famata* (*Candida flareri*). Проте використання мутантних штамів *C. famata* *der8*, що дозволяло отримувати 21 г/л вітаміну, було припинено через низьку генетичну стабільність промислових продуцентів (Abbas and Sibirny, 2011). Однак, дріжджі, як одноклітинні еукаріоти, мають вагомні переваги у біотехнологічних процесах порівняно із грибами та бактеріями, що обумовлює інтерес до розробки нових штамів надпродуцентів з метою їх подальшого використання у промисловості. Насамперед, дріжджі є зручними у використанні для культивування в промисловому устаткуванні. Вони є стійкими до ураження фагами, а також продукують вітамін в експоненціальній фазі росту.

Розробка методів трансформації та запровадження метаболічної інженерії для модифікації геному цих організмів вже довели існування цікавого та перспективного напрямку дослідження. Завдяки цільовій надекспресії структурних та регуляторних генів біосинтезу вітаміну В₂ було створено стабільний надпродуцент *C. famata* BRP (Dmytruk et al., 2011; 2014). Тому метою цієї роботи була ідентифікація та дослідження принципів дії нових чинників, залучених у процеси біосинтезу рибофлавіну флавіногенними дріжджами *C. famata*.

Флавіногенними називають організми, що характеризуються здатністю до надсинтезу рибофлавіну та інших флавінів за умов недостатнього постачання клітин іонами Феруму (Tanner et al., 1945).

Одним із етапів виконання дисертаційної роботи було конструювання штамів дріжджів *C. famata* із пошкодженим геном *IMA1*, що кодує α

субодиницю вакуолярної аденозинтрифосфатази (АТФ-ази). Отримання делеційного мутанта дозволило продемонструвати, що *Vma1* здійснює регуляторний вплив на утворення рибофлавіну досліджуваними дріжджами. Вочевидь, це роль негативного регулятора, адже сконструйований штаб *vma1Δ* характеризується підвищенням більше, ніж у дев'ять разів синтезом рибофлавіну. У перерахунку на один грам біомаси, отриманий штаб продукує у 27 разів більше рибофлавіну, ніж вихідний штаб. Нагромадження біомаси штабом *vma1Δ* знизилося майже втричі. Крім того, отриманий штаб дріжджів проявляв чутливий до температури фенотип. Ріст та флавіногенез штаму значно погіршилися при культивуванні за температури 35 С. Однак, одночасно вдалося з'ясувати, що батьківський штаб *C. famata* є більш термотолерантним і, у відповідь на підвищення температури, розпочинає синтезувати більше рибофлавіну, ніж при рості за 28°C. Подібний позитивний ефект делеції гена вакуолярної АТФ-ази було попередньо продемонстровано у флавіногенних дріжджів *Pichia guilliermondii* (Boretsky et al., 2011).

У представленій роботі також вивчено питання впливу промоторів гена *SEF1* із різних, флавіногенних та нефлавіногенних, видів дріжджів на індукцію утворення рибофлавіну. Варто зазначити, що транскрипційний фактор *Sef1* є одним із позитивних регуляторів синтезу вітаміну В₂ у флавіногенних дріжджах, зокрема у *C. famata* (Dmytruk et al., 2006). Нами встановлено, що промотори *SEF1* із флавіногенних дріжджів *Candida albicans* та, меншою мірою, *Candida tropicalis*, злиті з ВРЗ (відкритою рамкою зчитування) гена *SEF1* із *C. famata*, впливають на здатність до відновлення надпродукції рибофлавіну у мутанта *sef1Δ*. Цей метод надекспресії гена допоміг підвищити рівень синтезу метаболіта у 20 разів.

Під час виконання дисертаційної роботи завдяки додатковому посиленню експресії гена *GND1* вдалося підвищити вміст рибофлавіну у культуральній рідині у 2; 1,5 та 1,3 рази, порівняно із вихідними штабами L20105, AF-4 та BRP. Гени *ZWF1*, *SOL3* та *GND1* кодують ферменти окиснювального етапу пентозофосфатного шляху (ПФС). А саме глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу

(*ZWF1*), 6-фосфоглюконолактоназу (*SOL3*) і 6-фосфоглюконатдегідрогеназу (*GND1*). ПФШ є джерелом одного із попередників синтезу рибофлавіну – рибулозо-5-фосфату. Отже, за допомогою методів метаболічної інженерії, ймовірно, можна досягти переспрямування метаболізму у бік утворення цього інтермедіату, а отже, стимулювати флавіногенез. Ми також показали, що надекспресія гена *ZWF1*, навпаки, інгібує біосинтез рибофлавіну та ростові процеси загалом.

Попередні дослідження співробітників Інституту біології клітини НАН України показали можливість покращити синтез рибофлавіну за допомогою підвищення рівня синтезу його пуринового попередника – ГТФ (гуанозинтрифосфату). Таким чином, індукована експресія генів *PRS3m* та *ADE4m*, що кодують ферменти пуринового шляху сприяла збільшенню продукції вітаміну B₂ удвічі (Dmytruk et al., 2020). У дисертаційній роботі вперше показано позитивний ефект дерепресії гена 6-фосфоглюконатдегідрогенази на синтез вітаміну B₂ флавіногенними дріжджами.

У представлений роботі ми висвітлили дані про трансформанти, що мали посилену експресію обидвох генів ПФШ, а саме L20105/*ZWF1*/*GND1*, AF-4/*ZWF1*/*GND1* та BRP/*ZWF1*/*GND1*. Вони характеризувалися лише мініорним збільшенням кількості флавінів. Зростання становило не більше ніж у 1,05 рази, порівняно із батьківськими штамми.

Крім того, нам вдалося виявити, що надекспресія гена *SOL3* також здатна впливати на надсинтез рибофлавіну. Хоча цей позитивний вплив дуже незначний (збільшення виходу вітаміну на один грам біомаси від 1,05 до 1,5 разів), проте розкриває ще ширший потенціал обраного напрямку дослідження. Це надало розуміння того, що надекспресія гена *SOL3* у комбінації з *GND1* та/або *ZWF1* може привести до значно більшого накопичення рибофлавінового попередника Ру5Ф, а отже, ще більше стимулювати утворення рибофлавіну.

У ході виконання дисертаційної роботи ми також підтвердили, що трансформантам із індукованою експресією гена фермента 6-

фосфоглюконатдегідрогенази властиво синтезувати ще більші кількості рибофлавіну в середовищі з лактозою як єдиним джерелом Карбону. Так, Вирощування штамів на молочній сироватці, в якій лактоза є єдиним джерелом вуглецю, сприяло ще більш інтенсивному утворенню вітаміну B₂. Загалом зміна середовища культивування дозволила збільшити рівень синтезу у 1,4; 1,7 та 1,7 для штамів L20105/GND1, AF-4/GND1 та BRP/GND1, порівняно із синтезом на мінімальному середовищі з глюкозою.

Виконуючи роботу, ми вперше дослідили локалізацію білка-екскретази Rfe1 (RiboFlavin Excretase) у дріжджів *C. famata*. Прикріплення флуоресцентної мітки до цього білка дозволило виявити, що Rfe1, надекспресія гена якого сприяє вивільненню рибофлавіну у культуральне середовище, розташований по периферії клітин. Також, ми довели, що цей протеїн не функціонує у ядрі.

Викладені дані експериментальних досліджень є значущими для розуміння певних механізмів контролю над біосинтезом рибофлавіну. Потенціал до використання дріжджів *C. famata* на промисловому рівні отримання вітаміну B₂ було підтверджено ще з часів використання у виробництві штама *C. famata* der8. У сучасному світі відбувається поступове виявлення дослідниками нових регуляторних чинників флавіногенезу. Наш вклад у цей поступ є важливим та може, в подальшому, сприяти створенню нових стабільних надпродуцентів рибофлавіну, а отже, підвищити рентабельність виробничих процесів. Зокрема, використання сироватки як субстрату для росту штамів дає ширші можливості зробити процес дешевшим і сприятливим для збереження стану навколишнього середовища, оскільки сироватка, зазвичай, утворюється як відходи молочної промисловості.

Ключові слова: рибофлавін, вітамін B₂, флавіногенні дріжджі, *Candida famata*, флавіногенез, пентозофосфатний шлях, лактоза.

ANNOTATION

Andreieva Y. A. Mechanisms of action of new regulatory factors of the riboflavin synthesis by flavinogenic yeasts. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for PhD degree in specialty 091 - Biology. – Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2022.

This dissertation clarifies metabolic engineering applications to reveal new correlations of regulation in riboflavin synthesis by flavinogenic yeasts *Candida famata*. The data can be further applied to create a stable superproducers of this compound.

Riboflavin (vitamin B₂, or lactoflavin) plays a crucial role in the metabolism of living organisms. First of all, this compound is a precursor of flavin cofactors flavin mononucleotide (FMN) and flavinadine dinucleotide (FAD). Both FMN and FAD play a key role in energy metabolism and are necessary for the functioning of numerous oxidative and reductive reactions in all aerobic life forms (Suwannasom et al., 2020). Riboflavin activates the phagocytic activity of neutrophils and macrophages, and stimulates the reproduction of neutrophils and monocytes (Araki et al., 1995). Decreased concentration of vitamin B₂ in cells leads to a decrease in the rate of their proliferation (Mazur-Bialy et al., 2013). Riboflavin deficiency can lead to inflammatory diseases such as infectious skin inflammation, cheilitis, glossitis (Powers, 2003), sepsis (Toyosawa et al., 2004a; Toyosawa et al., 2004b), cataracts and migraines.

Despite the importance of this component for the proper functioning of metabolic pathways, humans and animals are unable to produce their own riboflavin. The source of this vitamin is food. However, the diet of modern man is not always balanced. Consequently, the current market for riboflavin is focused on several directions: the production of food supplements for humans, the production of beverages (vitamin B₂ is added as a natural pigment to provide bright yellow color),

the medical industry and the production of animal feed with riboflavin. Microbiological synthesis, which has a number of advantages over chemical synthesis, covers all industrial production of riboflavin.

Breeding strains of *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, and *C. famata* (*Candida flareri*) were used in the industrial production of riboflavin. However, the use of mutant strains of *C. famata* dep8, which allowed to obtain 21 g/L of vitamin, was discontinued due to low genetic stability of industrial producers (Abbas and Sibirny, 2011). However, yeasts, as unicellular eukaryotes, have significant prerogatives in biotechnological processes compared to fungi and bacteria. This fact leads to increased interest in developing new strains of overproducers for further use in industry. First of all, yeasts are easy to use for cultivation in industrial equipment. They are resistant to phage damage, producing the vitamin in the exponential phase of growth. Also, *C. famata* have the status of GRAS, which indicates the safety of consumption of products obtained by microbiological synthesis involving these microorganisms.

The development of a method of transformation of yeasts *C. famata* have been conducted (Dmytruk et al., 2011; 2014). Further genome modification of these organisms by using metabolic engineering have already shown the existence of an interesting and promising area of research. And the strain *C. famata* BRP was created as outcome from usage of targeted overexpression of structural and regulatory genes of vitamin B₂ biosynthesis (Dmytruk et al., 2014). Therefore, the aim of this work is to identify and study the principles of action of new factors involved in the biosynthesis of riboflavin by the flavinogenic yeast *C. famata*.

Flavinogenic organisms are those that are characterized by the ability to oversynthesize riboflavin and other flavins under conditions of insufficient supply of iron ions to cells (Tanner et al., 1945).

One of the stages of the dissertation was the construction of *C. famata* strains with a damaged *VMA1* gene coding for the synthesis of the α subunit of vacuolar ATPase. Obtaining deletion mutants allowed to demonstrate that the Vma1 has a regulatory effect on the formation of riboflavin by the studied yeast. Apparently, this

is the role of the negative regulator, because the designed strains are characterized by more than nine-fold increased synthesis of riboflavin. The resulting strain produces 27 times more riboflavin than the original strain by one gram of cells. The accumulation of biomass by strain *vma1Δ* decreased almost three times, which suggests the possible creation of iron deficiency inside cells. In addition, these yeasts showed a temperature-sensitive phenotype. The growth and flavinogenesis of the strain deteriorated significantly when cultivated at 35 °C. However, at the same time, it was found that the parental strain of *C. famata* is more thermotolerant and, in response to increasing temperature, starts to synthesize more riboflavin than when grown at 28 °C. A similar positive effect of deletion of the vacuolar ATPase gene has been previously demonstrated for the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii* (Boretsky et al., 2011).

The paper also examines the influence of *SEF1* gene promoters from different, flavinogenic and non-flavinogenic, yeast organisms on the induction of riboflavin formation. It should be noted that the transcription factor Sef1 is one of the positive regulators of vitamin B₂ synthesis in flavinogenic yeast, in particular in *C. famata* (Dmytruk et al., 2006). We found that *SEF1* promoters from the flavinogenic yeast *C. albicans* and, to a lesser extent, the non-flavinogenic yeast *C. tropicalis*, fused to the ORF (Open ReadinG Frame) of the *SEF1* gene from *C. famata*, affect the ability to restore riboflavin overproduction in *sef1Δ*. This method of overexpression of the gene allowed to increase the level of metabolite synthesis by 20 times.

As a part of this dissertation work, we have discovered that due to additional enhancement of *GND1* gene expression it is possible to increase the content of riboflavin in the culture fluid by 2, 1.5 and 1.3-fold, compared to the original strains L20105, AF-4 and BRP. This gene, along with others – *ZWF1* and *SOL3* encode enzymes of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (PPP). Namely glucose-6-phosphate dehydrogenase (*ZWF1*), 6-phosphogluconolactonase (*SOL3*) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (*GND1*). PPP is a source of one of the precursors of riboflavin synthesis – Ru5P (ribulose-5-phosphate). Therefore, with the help of metabolic engineering methods, it is probably possible to redirect the

metabolism towards the formation of this intermediate, and thus stimulate flavinogenesis. Moreover, we have shown that overexpression of the *ZWF1* gene inhibits riboflavin biosynthesis and growth of mutants. For the first time studies describe the positive effect of derepression of the 6-phosphogluconate dehydrogenase gene on the synthesis of riboflavin by flavinogenic yeast. Previously, some beneficial changes were demonstrated due to increased synthesis of purine precursor – GTP (guanosine triphosphate), but not Ru5P. Thus, induced expression of the *PRS3m* and *ADE4m* genes encoding purine pathway enzymes doubled the production of vitamin B₂ (Dmytruk et al., 2020).

In this thesis, we highlighted data about mutants with increased expression of both genes of PPP, namely L20105/*ZWF1*/*GND1*, AF-4/*ZWF1*/*GND1* and BRP/*ZWF1*/*GND1*. They were characterized only by a minor increase in the content of flavins. The increase was no more than 1.05 times compared to the parent strains.

In addition, we found that overexpression of the *SOL3* gene can also affect riboflavin oversynthesis. The positive effect is very small (increase in vitamin yield per gram of biomass from 1.05 to 1.5 times). Nevertheless it reveals an even wider potential of the chosen field of study. This data suggests that overexpression of the *SOL3* gene in combination with *GND1* and/or *ZWF1* may lead to significantly greater accumulation of the riboflavin precursor Ru5P, and thus further stimulate riboflavin production.

In the course of the dissertation we also confirmed that mutants with induced gene expression of the enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase tend to synthesize even greater amounts of riboflavin on a medium with lactose as a single source of carbon. Thus, the cultivation of strains on milk whey, in which lactose is the only source of carbon, contributed to an even more intense formation of vitamin B₂. In general, changes in the culture medium allowed to increase the level of synthesis by 1.4, 1.7 and 1.7 for strains L20105/*GND1*, AF-4/*GND1* and BRP/*GND1*, compared to synthesis on mineral medium with glucose.

In this work, we were first, who investigated the localization of the transporter protein Rfe1 (RiboFlavin Excretase) in the yeast *C. famata*. Binding a fluorescent

label to this protein revealed that Rfe1, whose overexpression promotes the release of riboflavin into the culture medium, is present in the plasma membrane. Moreover, we have proven that this protein does not function in the nucleus.

The presented experimental data are important for understanding certain mechanisms of control over riboflavin biosynthesis. The potential for the use of *C. famata* yeast at the industrial level of vitamin B₂ production has been confirmed since implementation of the strain *C. famata* dep8 in the production. Currently, researchers are gradually discovering new regulatory factors of flavinogenesis. Our contribution to this progress is important and may, in the future, contribute to the creation of new stable overproducers of riboflavin, and thus increase the profitability of production processes. In particular, the application of whey as a substrate for growth of strains provides greater opportunities to make the process cheaper and more environmentally friendly as the whey is usually disposed of as waste from the dairy industry.

Key words: riboflavin, vitamin B₂, flavinogenic yeast, *Candida famata*, flavinogenesis, pentose phosphate pathway, lactose.

Список публікацій здобувача:

За темою дисертації опубліковано 10 наукових робіт, серед яких три статті у міжнародних виданнях, а також сім тез доповідей у матеріалах конференцій, наукових з'їздів та конгресів.

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus:

1. **Andreieva, Y.**, Petrovska, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020). Role of the regulatory genes *SEF1*, *VMA1* and *SFU1* in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*, 37(9–10), 497–504. <https://doi.org/10.1002/yea.3503>. Q2. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, провела аналіз та узагальнення отриманих даних, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

2. Tsyurulnyk, A. O., **Andreieva, Y. A.**, Ruchala, J., Fayura, L. R., Dmytruk, K. V., Fedorovych, D. V., and Sibirny, A. A. (2020). 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*, 37(9–10), 467–473. <https://doi.org/10.1002/yea.3470>. Q2. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, провела аналіз та узагальнення отриманих даних, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

3. **Andreieva, Y.**, Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020). *SEF1* and *VMA1* Genes Regulate Riboflavin Biosynthesis in the Flavinogenic Yeast *Candida famata*. *Cytology and Genetics*, 54(5), 379–385. <https://doi.org/10.3103/s0095452720050023>. Q4. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, провела аналіз та узагальнення отриманих даних, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

Тези доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях, наукових з'їздах та конгресах:

4. **Andreieva, Y.**, Liu, W., Dmytruk, K., Sibirny, A. Evaluation of the effect of overexpressed genes *ZWF1* and *GND1* on riboflavin synthesis by flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flarerii*) // 8th International Conference

“Human – Nutrition – Environment”, October 13-14, Rzeszow, Poland. – 2021. – P. 66.

5. **Andreieva Y.**, Dmytruk K., Sibirny A. Evaluation of the impact of *VMA1* gene-deletion on the riboflavin production in the flavinogenic yeast *Candida famata* // 6 th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, June 18-21, Yaremche, Ukraine, Book of Abstracts. – 2019. – P. 83.

6. Sibirny, A., Fedorovych, D., Fayura, L., Tsyurulnyk, A., **Andreieva, Y.**, Petrovska, Y., Ruchala, J., Dmytruk, K. Construction of the Advanced Producer of Riboflavin on Whey and Lignocellulose Hydrolyzates in the Flavinogenic Yeast *Candida famata* // ISSY 35. The 35th International Specialized Symposium on Yeasts, 21- 25 October, Antalya, Turkey, Book of Abstracts. – 2019. – P. 54.

7. **Andreieva, Y.**, Dmytruk, K., Sibirny, A. Evaluation of the impact of *VMA1* gene-deletion on the riboflavin production in the flavinogenic yeast *Candida famata*. XV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of biology”; 2019 April 9-11; Lviv, Ukraine. – P. 80.

8. **Andreieva, Y.** Investigation of possible *VMA1* gene-deletion role in the riboflavin production in the flavinogenic yeast *Candida famata* // Conference of young scientists of the Institute of Cell Biology, May 29, Lviv, Ukraine, Book of Abstracts. – 2019. – P. 12.

9. Dmytruk, K., Lyzak, O., **Andreieva, Y.**, Petrovska, Y., Fedorovych, D., Sibirny A. Riboflavin oversynthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* // Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. 15-18 May, 2018. Rzeszow, Poland. – P. 106.

10. **Andreieva, Y.**, Lyzak, O., Dmytruk, K., Sibirny A. Analysis of *Candida famata SEF1* gene expression under control of *SEF1* promoters from other yeast species // International Conference «Advances in Microbiology and Biotechnology», October 29-31, Lviv, Ukraine, Book of Abstracts. – 2018. – P. 59.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ANNOTATION	7
Список публікацій здобувача.....	12
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	17
ВСТУП	18
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	27
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1. Біосинтез рибофлавіну та флавінових коферментів.....	27
1.1.1. Біосинтез рибофлавіну та флавінових коферментів у бактерій і рослин...	28
1.1.2. Біосинтез рибофлавіну та флавінових коферментів у дріжджів та цвілевих грибів.....	33
1.2. Генетичний контроль біосинтезу рибофлавіну у мікроорганізмів.....	35
1.2.1. Регуляція флавіногенезу на рівні транскрипції у бактерій.....	35
1.2.2. Регуляція біосинтезу рибофлавіну на рівні транскрипції у флавіногенних дріжджів	37
1.2.3. Регуляція біосинтезу рибофлавіну на рівні транскрипції у цвілевих грибів.....	43
1.3. Пентозофосфатний шлях та його функції у синтезі рибофлавіну.....	44
1.4. Конструювання поліпшених продуцентів рибофлавіну у дріжджів.....	46
1.5. Підсумок	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
2.1. Матеріали досліджень	52
2.2. Штами мікроорганізмів	52
2.3. Плазмідні	52
2.4. Праймери	53
2.5. Поживні середовища, умови культивування мікроорганізмів.....	53
2.6. Біохімічні методи	54
2.6.1. Отримання безклітинних екстрактів.....	54
2.6.2. Визначення активності ферментів.....	55

2.7. Визначення біомаси.....	55
2.8. Визначення концентрації рибофлавіну.....	56
2.9. Основні молекулярно-генетичні методи.....	56
2.9.1. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів.....	56
2.9.2. Виділення плазмідної ДНК з клітин <i>E. coli</i>	57
2.9.3. Конструювання плазмід.....	58
2.9.4. Базові молекулярно-генетичні методи.....	58
2.9.5. Трансформація клітин дріжджів.....	59
2.9.10. ПЛР у реальному часі.....	59
2.10. Програмне забезпечення для пошуку та аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей.....	60
2.11. Статистичний аналіз експериментальних даних.....	60
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	61
3.1. Дослідження впливу делеції гена <i>VMA1</i> на синтез рибофлавіну дріжджами <i>C. famata</i>	61
3.2. Транскрипційний фактор Sef1 та його вплив на процеси флавіногенезу у дріжджів <i>C. famata</i>	67
3.2.1. Роль промотора гена транскрипційного фактора Sef1 флавіногенних та нефлавіногенних дріжджів у біосинтезі рибофлавіну флавіногенними дріжджами <i>C. famata</i>	69
3.3. Дослідження ролі генів ферментів окиснювального етапу пентозофосфатного шляху у біосинтезі рибофлавіну.....	75
3.3.1. Визначення впливу надекспресії генів <i>ZWF1</i> та <i>GND1</i> на біосинтез рибофлавіну дріжджами <i>C. famata</i>	76
3.3.2. Вплив надекспресії гена 6-фосфоглюконатдегідрогенази на синтез рибофлавіну дріжджами <i>C. famata</i> на YNB з глюкозою та на молочній сироватці.....	83
3.3.3. Посилення експресії Sol3 у дріжджах <i>C. famata</i> та аналіз біосинтезу рибофлавіну.....	86

3.4. Виявлення локалізації білка-екскретази Rfe1 у клітинах дріжджів <i>S. famata</i>	90
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	94
ВИСНОВКИ.....	98
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	100
ДОДАТОК 1.....	125
ДОДАТОК 2.....	127
ДОДАТОК 3.....	131

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

6ФГДГ – 6-фосфоглюконатдегідрогеназа

6ФГ – 6-фосфоглюконат

BCRP – breast cancer resistance protein (білок клітин раку молочної залози, що обумовлює стійкість до лікарських засобів)

BRP – Best Riboflavin Producer (найкращий продуцент рибофлавіну)

Rfe1 – RiboFlavin Excretase (рибофлавін-екскретаза)

Vma1 – Vacuolar Membrane Atpase (α субодиниця вакуолярної АТФ-ази)

YNB – Yeast Nitrogen Base (стандартне мінімальне середовище)

АТФ – аденозинтрифосфат

АТФ-аза – аденизонтрифосфатаза

ВРЗ – відкрита рамка зчитування

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДБФ – 3,4-дигідрокси-2 бутанон-4-фосфат

ДМРЛ – 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин

НАДФ⁺ (Н) – (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (відновлений))

п.н. – пари нуклеотидів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

Рy5Ф – рибулозо-5-фосфат

РФ-синтаза – рибофлавінсинтаза

РФ-кіназа – рибофлавінкіназа

РФ-5'-фосфотрансфераза – рибофлавін-5'-фосфотрансфераза

т. п. н. – тисяча пар нуклеотидів

ПФШ – пентозофосфатний шлях

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа

ФАД – флавінаденіндинуклеотиду

ФМН – флавінмононуклеотид

ВСТУП

Актуальність теми

Флавіни є групою органічних сполук похідних ізоалаксазину. Ці гетероциклічні молекули необхідні усім живим організмам і забезпечують різноманітний спектр специфічних каталітичних подій в клітині. Біохімічним джерелом флавінів в організмі є рибофлавін – $C_{17}H_{20}N_4O_6$ (РФ, вітамін B_2 або лактофлавін). Похідні рибофлавіну – флавінмононуклеотид (ФМН) та флавінаденіндинуклеотид (ФАД) є незамінними в організмі, бо виступають у ролі коферментів флавопротеїнів.

Окисно-відновні властивості ФМН і ФАД відіграють ключову роль у реакціях двоелектронної дегідрогенізації та одноелектронного переносу (Beztsinna et al., 2016). Дефіцит рибофлавіну може призвести до підвищеного ризику серцево-судинних захворювань, аплазії еритроцитів, порушення обміну заліза, захворювань шкіри, ураження нервової системи та глаукоми. Детальний аналіз функцій рибофлавіну у організмі, а також природу захворювань, до яких може призвести арибофлавіноз та новітні способи уникнення відповідних захворювань описано авторами огляду (Suwannasom et al., 2020).

Вітамін B_2 , незважаючи на свою надважливу роль у метаболізмі, не синтезується в організмі тварин та людини. Це є однією із причин зростання інтересу до розробки способів синтезу цих сполук за допомогою інших організмів. Рослини, більшість бактерій та, зрештою, дріжджі характеризуються природнім утворенням цієї сполуки у власних клітинах. Більше того, деякі організми здатні до підвищеного рівня продукції рибофлавіну.

Зараз вітаміни отримують шляхом мікробної ферментації (Vandamme and Revuelta, 2016). При органічному синтезі рибофлавіну раніше часто використовувалися невідновлювані хімічні речовини і утворювалися небезпечні відходи. У органічному синтезі вітаміну B_2 використовували токсичні сполуки (Eggersdorfer et al., 2012). Ці дані, а також економічний фактор були рушійними для розвитку вивчення синтезу рибофлавіну мікроорганізмами протягом

останніх десятиліть. Дослідження мутагенезу та селекція штамів цвілевих грибів *Ashbya gossypii* та бактерій *Bacillus subtilis* дозволили перейти до виробництва вітамінів за допомогою мікроорганізмів (Acevedo-Rocha et al., 2019). Обсяг світового ринку вітамінів отриманих мікробіологічним синтезом з 1999 по 2012 рік зріс з 5 до 75% (Schwechheimer et al., 2016). Станом на 2021 рік світовий ринок рибофлавіну оцінюється в 397,0 мільйонів доларів США. Прогнозують, що цей рівень зросте на 6,65% упродовж 2022 – 2027 років. У 2021 році обсяг ринку становив 12 716,5 тонн (*Riboflavin Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, And Forecasts (2022 - 2027)*, 2022). Звичайно, масштаби ринку та вартість продукції залежать від застосування сировини. Найбільша частка споживання рибофлавіну припадає на добавки до кормів у тваринництві (приблизно 70%) (Kato and Park, 2012). Серед інших секторів використання вітаміну В₂ – фармацевтичні препарати у якості харчових добавків для раціону людей, харчова промисловість (у якості природного пігменту жовтого кольору) та хімічна промисловість. Сучасний ринок вітаміну В₂ обумовлений зростаючим попитом на харчові добавки. Особливо, це прослідковується у західних країнах, де раціон харчування, зокрема літніх людей, є бідним на вміст рибофлавіну (*Riboflavin Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, And Forecasts (2022 - 2027)*, 2022).

Загалом біосинтез рибофлавіну та його використання в промисловості має ряд переваг, адже це дозволило зменшити шкідливий вплив на навколишнє середовище та витрати виробництва на 43%, а також використовувати у роботі відновлювані ресурси, такі як цукри та рослинні олії (Revuelta et al., 2016; Lim et al., 2001; Stahmann et al., 2000; Vandamme, 1992). На додаток, отримані у результаті ферментативних процесів препарати рибофлавіну не містять аніліну, що є небажаною домішкою в хімічно синтезованому вітаміні (Zu Berstenhorst et al., 2009). Окрім того, рибофлавін, утворюваний *Eremothecium ashbyii*, має статус GRAS (Generally Recognized As Safe), що є важливим для контролю Управлінням з продовольства і медикаментів у США (FDA) (Belenky et al., 2011).

Для комерційної продукції рибофлавіну використовують селекціоновані штами бактерій *B. subtilis*, цвілевих грибів *A. gossypii*, дріжджів *Candida famata* (*Candida flareri*). Якщо раніше надпродуценти рибофлавіну отримували шляхом класичної селекції, сучасні надпродуценти отримують з використанням підходів метаболічної інженерії, які передбачають надекспресію структурних і регуляторних генів біосинтетичного шляху рибофлавіну, а також генів, що беруть участь у надсинтезі попередника рибофлавіну, пуринового нуклеотиду ГТФ. Проте промислове виробництво рибофлавіну з використанням мутантних штамів *C. famata* *der8* (ATCC 20849), що були отримані за допомогою конвенційного мутагенезу, було припинено через низьку генетичну стабільність промислових продуцентів (Abbas and Sibirny, 2011).

Серед сучасних виробників рибофлавіну відома, зокрема, німецька компанія BASF SE, що використовує покращені штами *A. gossypii*. Ця компанія посідає провідну позицію у сучасному виробництві вітаміну B₂. Китайська компанія Hubei Guangji Pharmaceutical посідає другу позицію серед лідерів на ринку рибофлавіну. Нідерландська компанія DSM, що працює з продуцентами на основі грампозитивних бактерій *B. subtilis*, займає третє місце за потужностями виробництва. Компанії Shanghai Acebright Pharmaceuticals Group та Xinfu Pharmaceutical, що працюють у Китаї також є важливими постачальниками вітаміну B₂ на світовий ринок (Kato and Park, 2012; *Riboflavin Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, And Forecasts (2022 - 2027)*, 2022).

Широке використання зазначеного вітаміну як компонента лікарських засобів, продуктів харчування, косметичних засобів та як кормових додатків у тваринництві зумовлює постійне зростання попиту на його виробництво. Ми припускаємо, що повернення дріжджів у русло продуцентів рибофлавіну на промисловому рівні може забезпечити значний поступ цього комерційного напрямку. По-перше, дріжджі є технологічно вигіднішими для використання у промисловості, адже, на відміну від цвілевих грибів, ці одноклітинні еукаріотичні організми не утворюють міцелій, що ускладнює процеси подачі середовища та повітря за умов культивування мікроорганізмів. По-друге,

дріжджі, на відміну від бактерій, є стійкими до ураження фагами. Крім того, перевагою дріжджів є продукція вітаміну B₂ в експоненціальній фазі росту.

Шлях біосинтезу рибофлавіну у дріжджів відомі, однак, механізми регуляції цих процесів вивчені недостатньо. У розробці раціональних підходів метаболічної інженерії для дріжджів *C. famata* здійснено значний прогрес. На початку 21 століття вдалося розробити методи трансформації (Voronovsky et al., 2002) та інсерційного мутагенезу (Dmytruk et al., 2006) для дріжджів *C. famata*. Крім того, клоновано структурні та регуляторні гени шляху біосинтезу рибофлавіну у цих флавіногенних дріжджів (Dmytruk et al., 2004, Voronovsky et al., 2004, Dmytruk et al., 2006). Застосування методів метаболічної інженерії цього виду дріжджів, з метою цільової надекспресії структурних та регуляторних генів біосинтезу вітаміну B₂ дало можливість сконструювати стабільний надпродуцент, що позначається як #91 або BRP (Dmytruk et al., 2014). На жаль, цей штам потребує подальшого удосконалення, адже рівень синтезу рибофлавіну 1,6 г/л не є конкурентоздатним, крім того, штам характеризується дуже повільним ростом. Це завдання може бути виконане за умови розуміння принципів дії регуляторних механізмів флавіногенезу в дріжджах. Ми припускаємо, що робота у напрямку поглиблення знань про фактори контролю процесів утворення рибофлавіну у дріжджів може допомогти здійснити націлену на регуляторні фактори модифікацію геному цих організмів. Використання цих підходів з метою зміни їхнього метаболізму у бік збільшення виходу рибофлавіну є перспективним для створення конкурентоспроможних промислових штамів-продуцентів рибофлавіну. В подальшому, результати цієї роботи могли б оптимізувати виробництво вітаміну B₂ та задовольнити потреби світового ринку. Не менш важливо, реалізація подібних проєктів українськими науковцями у співпраці з фармацевтичними, косметологічними та харчовими компаніями на території України буде сприяти економічному зміцненню і відновленню держави у воєнні та післявоєнні роки. Крім того, це стане позитивним чинником для повернення переселенців на територію країни або ж уникнути еміграції

населення, адже наявність робочих місць на тій чи іншій території є значною перевагою при виборі місця проживання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Викладена робота була виконана як одна із частин фундаментальних досліджень у відділі Молекулярної генетики та біотехнологій Інституту біології клітини НАН України за темами: «Генетичний контроль біосинтезу та транспорту рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (№ держ. реєстрації 0115U001362, 2015 – 1019); «Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмів: алкогольної ферментації, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глутатіону» (Рішення Експертної ради з питань оцінювання тем фундаментальних науково-дослідних робіт при НАН України від 17.06.2015 № 3, 2016-2019); «Вивчення механізму дії нових генів в регуляції синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Candida famata*» (Постанова Бюро ВБФМБ НАН України від 02.10.2018 № 5, № держ. реєстрації 0119U001677, 2019-2020); «Ідентифікація та з'ясування ролі нових структурних та регуляторних генів у надсинтезі рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (Постанова Бюро ВБФМБ НАН України від 26.11.2020 № 4, № держ. реєстрації 0121U10926, 2021-2025).

Частина експериментальної роботи виконана у межах досліджень за грантом Польського національного наукового центру, Opus UMO-2018/29/B/NZ1/01-497 – «Regulatory mechanism involved in riboflavin overproduction in the flavinogenic yeast *Candida famata*». Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищезгаданих досліджень.

Мета і завдання дослідження

Метою роботи є ідентифікація та дослідження принципів дії чинників, залучених у процеси регуляції біосинтезу рибофлавіну флавіногенними дріжджами *C. famata*.

Для досягнення мети у дисертаційній роботі передбачалось виконання таких завдань:

I. Створити штами дріжджів із підвищеною продуктивністю перетворення джерел Карбону до рибофлавіну:

1) Отримати штами *C. famata* L20105 з делецією гена *IMA1*, що кодує вакуолярну АТФ-азу та з'ясувати, чи впливає продукт цього гена на регуляцію синтезу рибофлавіну у цих штамів;

2) Дослідити здатність промоторів гена *SEF1* із різних флавіногенних (*C. famata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*) і нефлавіногенних (*Scheffersomyces stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*) видів дріжджів регулювати експресію ВРЗ гена *SEF1* у *C. famata sef1Δ*.

3) Проаналізувати роль генів, що кодують ферменти окиснювального етапу пентозофосфатного шляху у біосинтезі рибофлавіну.

II. З'ясувати локалізацію білка-екскретази Rfe1 у клітинах *C. famata* з метою виявлення ролі надекспресії гена *RFE1* у надсинтезі рибофлавіну.

Об'єкт дослідження: регуляція флавіногенезу у дріжджів *C. famata*.

Предмет дослідження: механізм дії регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджах *C. famata*.

Методи досліджень

Для виконання роботи використали низку генетичних, біохімічних та мікробіологічних методів дослідження. Конструювання рекомбінантних векторів було здійснено за допомогою методів молекулярної біології, таких як гідроліз ДНК ендонуклеазами рестрикції, елюція фрагментів ДНК з агарозного гелю, дефосфорилування лінеаризованих векторів, лігування вектора з вставкою. Для введення рекомбінантних плазмід у клітини-реципієнти (бактерійні або дріжджові клітини) проводили трансформацію методом електропорації. Попередньо, для перевірки трансформантів виділяли плазмідну

або геномну ДНК бактерій або дріжджів, відповідно. Надалі, отриманий матеріал використовували для аналізу одержаних трансформантів методами ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) та ПЛР у реальному часі. Біохімічну характеристику рекомбінантних штамів здійснювали за допомогою визначення активності низки ферментів у безклітинних екстрактах. Також, найважливіший показник, а саме концентрацію синтезованого рибофлавіну визначали шляхом п'ятиденного культивування на різних субстратах та подальшим вимірюванням концентрації флавінів методами флуориметрії. Характеристики росту дріжджових культур аналізували методом спектрофотометрії. Для моделювання касет модифікації геному, опрацювання результатів та ін. застосовувалися методи комп'ютерного аналізу, біоінформатичні інтернет-ресурси та програмне забезпечення, електронні бази даних відомих генів.

Наукова новизна

Донедавна надпродуцентів рибофлавіну отримували за допомогою класичної селекції, але нові промислові продуценти на основі грампозитивних бактерій та цвілевих грибів було створено за допомогою сучасних підходів метаболічної інженерії, таких як надекспресія структурних та регуляторних генів флавіногенезу, та генів, що активують надпродукцію пуринового попередника рибофлавіну, ГТФ (гуанозинтрифосфату). Наші дослідження нерозкритих питань синтезу рибофлавіну стосуються з'ясування молекулярних механізмів регуляції синтезу вітаміну поза межами шляху флавіногенезу. Таким чином, на відміну від інших робіт, присвячених регуляції експресії генів дріжджів *C. famata*, що залучені у перетворення флавінових попередників (ГТФ та Ру5Ф (рибулозо-5-фосфату)) у вітамін В₂, ця робота сфокусована на модифікації експресії транскрипційного фактора Sef1, що був попередньо визначений як позитивний регулятор біосинтезу рибофлавіну *C. famata* (Dmytruk et al., 2006). В межах виконаної роботи виявлено, що лише під промоторами флавіногенних дріжджів експресія гена *SEF1* веде до збільшеної продукції рибофлавіну. Вперше показано, що для дріжджів *C. famata* α -

субодиниця вакуолярної АТФ-ази, що кодується геном *VMA1* відіграє роль негативного регулятора флавіногенезу.

Було сконструйовано штами *S. famata*, у яких покращено шлях біосинтезу пуринів з метою накопичування ГТФ як попередника рибофлавіну. Проте, у цій роботі зроблено акцент на збільшення продукції іншого попередника, а саме Ру5Ф, шляхом надекспресії гена *GND1*, що кодує фермент третьої реакції окиснювального етапу ПФШ (пентозофосфатного шляху).

Крім того, новизна роботи полягає у виявленні локалізації білка екскретази вітаміну В₂ у клітинах дріжджів *S. famata*.

Практичне значення наукових результатів

Виявлені закономірності регуляції синтезу рибофлавіну можуть бути використані для конструювання нових стабільних надпродуцентів шляхом комбінації в модифікації експресії кількох регуляторних факторів. Такі штами, за умови їхньої стабільності, були б здатні конкурувати із вже існуючим *S. famata* der8. Це дасть можливість впровадити відповідні штами в промислове виробництво, в тому числі на біотехнологічних підприємствах України.

Особистий внесок здобувача

Аспірантка розробила план проведення досліджень для виконання визначених завдань із допомогою наукового керівника. Спільно із науковим керівником дисертант аналізувала результати експериментальних досліджень. Здобувач займалася пошуковою роботою методів та методик для підбору найкращого з них, аби досягнути поставленої мети експерименту. Проте науковий керівник в разі потреби долучався до цього процесу. Підготовка наукових публікацій проводилася аспіранткою за консультативної підтримки наукового керівника, а вибір журналу здійснювався науковим керівником. Представлені у дисертації результати були отримані проведенням наукових досліджень аспіранткою у співпраці з співавторами публікацій.

Автор дисертації висловлює щире подяку науковому керівнику, співавторам публікацій та усім працівникам Інституту біології клітини, хто долучився до отримання викладених в дисертаційній роботі результатів досліджень.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей.

Серед конференцій, на яких було представлено отримані результати – Міжнародна конференція «Advances in Microbiology and Biotechnology» (Lviv, Ukraine, 2018), 35 міжнародний симпозіум по дріжджах (Antalya, Turkey, 2019), VI Український конгрес з біології клітини з міжнародним представництвом (Yaremche, Ukraine), VIII міжнародна конференція «Human – Nutrition – Environment» (Rzeszow, Poland, 2021), XV міжнародна конференція «Молодь і поступ біології» (Lviv, Ukraine, 2019), Міжнародна конференція «Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application» (Rzeszow, Poland, 2018).

Загалом за темою дисертації опубліковано 10 наукових робіт, серед яких три статті у міжнародних виданнях проіндексованих у базі даних Scopus та Web of Science Core Collection, та сім тез доповідей у матеріалах конференцій, наукових симпозіумів та конгресів.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів», «Висновки» та «Список використаних джерел». Дисертацію викладено на 133 сторінках друкованого тексту, з них основна частина займає 71 сторінку. Робота містить 20 рисунків, вісім таблиць та одну формулу. Список використаної літератури налічує 193 джерела літератури. У кінці роботи долучено три додатки.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біосинтез рибофлавіну та флавінових коферментів

Рибофлавін – важливий компонент багатьох фізіологічних реакцій живих організмів. Хімічна структура цієї молекули являє собою 7,8-диметил-10-рибітил-ізоалоксазин, що складається з ізоалоксазинового кільця, зв'язаного з бічним ланцюгом пентозного спирту, рибітилу (Рис. 1.1, А) (Dym and Eisenberg, 2001). Дослідження його біосинтезу розпочалося ще в 1950 році (Fischer and Vacher, 2006). Проте, як виявилось, не всі живі організми здатні до продукування цього вітаміну.

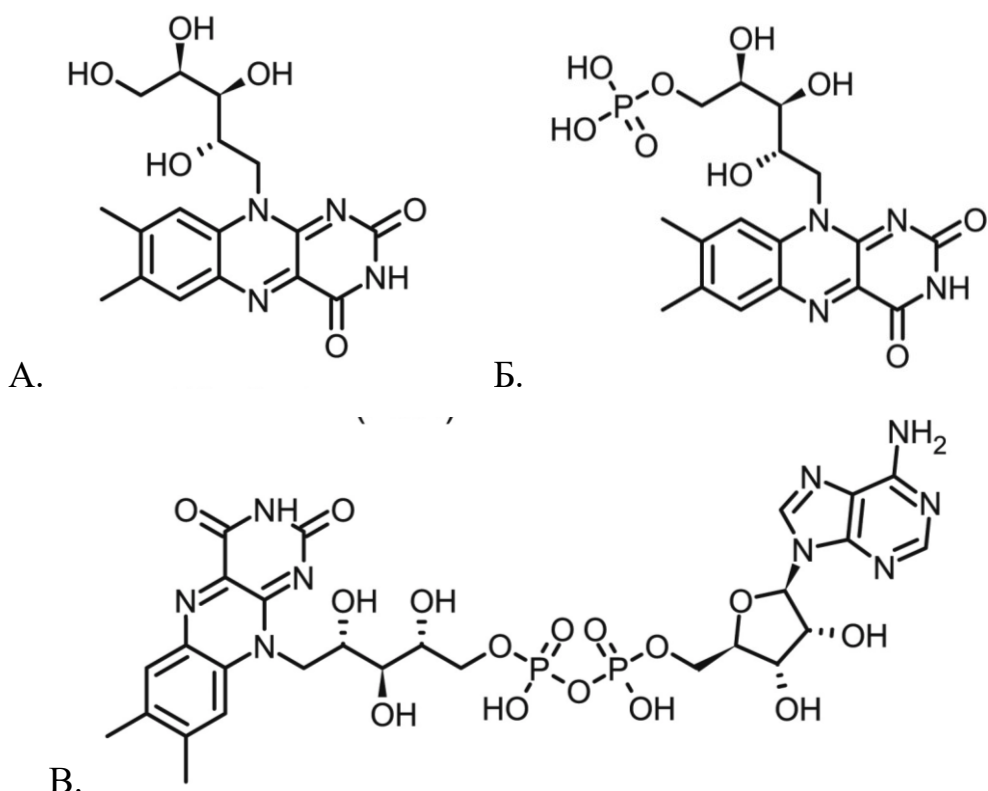


Рис. 1.1. Структура (А) рибофлавіну (РФ), (Б) флавінмононуклеотиду (ФМН) і (В) флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) (Ikeya and Woodward, 2021).

Усі рослини, гриби, дріжджі та більшість бактерій синтезують рибофлавін. На противагу, тваринні організми, а також деякі прокаріоти (наприклад, певні молочнокислі бактерії) здатні лише метаболізувати поглинутий з середовища рибофлавін до флавінових коферментів – ФМН та ФАД (Рис. 1.1, Б, В) (Abbas and Sibirny, 2011).

Процес синтезу цієї сполуки розпочинається з попередників ГТФ та Р_у5Ф і описується реакціями, що каталізуються шістьма ферментами (Fischer and Bacher, 2010).

1.1.1. Біосинтез рибофлавіну та флавінових коферментів у бактерій та рослин

Більшість досліджень синтезу рибофлавіну було проведено на мікроорганізмах. На початкових етапах роботи вся увага була зосереджена на цвілевих грибах аскоміцетах, а саме – *E. ashbyii* та *Ashbya gossypii*, а також на дріжджах, серед яких кілька видів роду *Candida*. Це обумовлювалося природною появою флавіногенних представників цих організмів (Fischer and Bacher, 2006).

Лише згодом певні еубактерії, включаючи *Escherichia coli* і *Bacillus subtilis*, а також нефлавіногенні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* набули популярності у роботах з вивчення біосинтезу рибофлавіну. Щодо досліджень синтезу рибофлавіну у рослин, то у широкому масштабі вони були розпочаті лише у 90-х роках 20 століття (Fischer and Bacher, 2006).

E. coli і *B. subtilis* є представниками бактерій, хімізм флавіногенезу яких вивчений найкраще. Основні етапи цього процесу у них однакові (Shavlovskii, and Logvinenko, 1988). Першу реакцію флавіногенезу каталізує ГТФ-циклогідролаза II (Рис. 1.2 – 1), яка кодується геном *ribA* та, яку було виділено із *E. coli*. Цей процес супроводжується відщепленням форміату та пірофосфату з імідазольного кільця, що вимагає розщеплення двох С-N зв'язків від рибофлавінового попередника ГТФ. У результаті першої реакції утворюється 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат (ДАРПФ) (Foog

and Brown, 1975). Існує також фермент ГТФ-циклогідролаза I, що має дуже схожий механізм проведення реакції, проте він не залучений у флавіногенез, а бере участь у біосинтезі фолієвої кислоти та біоптерину (Bracher et al., 1998; Fischer and Bacher, 2005).

У архей і деяких еубактерій також виявлено інший тип ГТФ-циклогідролази – III, що не має гомології із ГТФ-циклогідролазою II. Цей фермент каталізує перетворення ГТФ до 2-аміно-5-форміламіно-6-рибозиламіно-4(3H)-піримідиндіон-5'-фосфат. Тобто, на відміну від ГТФ-циклогідролази II, гідролізує імідазольне кільце, але не видаляє формільну групу формаміду. У архей *Methanocaldococcus jannaschii* ГТФ-циклогідролаза III бере участь у біосинтезі рибофлавіну та деазафлавіну, утворюючи продукт, від якого фермент формамід гідролаза відщеплює форміат. Тобто, ДАРПФ у архей утворюється в результаті послідовної дії двох ферментів ГТФ-циклогідролази III та формамід гідролази (Grochowski et al., 2009).

На другому етапі проходить дезамінування піримідинового попередника рибофлавіну ферментом 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3H)-піримідинон-5'-фосфат дезаміназою (Рис. 1.2 – 2) з утворенням 5-аміно-6-рибозиламіно-2,4(1H,3H)-піримідиндіон-5'-фосфату (АРПФ) (Burrows and Brown, 1978).

Третій етап – рибоза попереднього інтермедіата відновлюється в рибітил (5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1H,3H)-піримідиндіон-5'-фосфат, АрПФ) за участю НАДФ(Н)-залежного фермента 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3H)-піримідинон-5'-фосфат редуктази (Рис. 1.2 – 3).

У архей та грибів, послідовність останніх двох етапів зворотна до такої у еубактерій. Тобто відновлення бічного ланцюга передусь дезамінуванню (Graupner et al., 2002). Фермент, що бере участь у реакції використовує як відновники НАДФН (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений), так і НАДН (нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений).

На четвертому етапі відбувається дефосфорилювання АрПФ за допомогою неспецифічної фосфатази до 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1H,3H)-піримідиндіону (АрП) (Рис. 1.2 – 6).

П'ятий етап у синтезі рибофлавіну бактеріями супроводжується тим, що утворений у попередній реакції інтермедіат АрП взаємодіє з 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатом (ДБФ), який попередньо утворюється з рибулозо-5-фосфату за допомогою ДБФ-синтази (Рис. 1.2 – 7). У результаті конденсації АрП та ДБФ під дією фермента люмазинсинтази, або ДМРЛ-синтази утворюється 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин (ДМРЛ) (Рис. 1.2 – 8). Фермент РФ-синтаза здійснює дисмутацію двох молекул ДМЛР з утворенням рибофлавіну і АрП (Рис. 1.2 – 9) (Neuberger and Bacher, 1986; Winestock et al., 1963).

ФМН (рибофлавін-5'-фосфат) утворюється шляхом специфічного фосфорилування рибофлавіну в 5'-положенні рибітилового ланцюга в реакції, що каталізується РФ-кіназою (Рис. 1.2 - 10). Інші назви цього фермента – флавокіназа, ФМН-синтаза, РФ-5'-фосфотрансфераза. Всього виявлено дві групи РФ-кіназ. Одна група представлена у грибів, рослин, тварин, архей та (рідко) еубактерій монофункціональними білками РФ-кінази (Bacher, 1991). Біфункціональна РФ-кіназа/ФАД-синтетаза виявилася основним ферментом у еубактерій, що залучений в біосинтез флавінових нуклеотидів (Efimov et al., 1998; Mack et al., 1998).

У рослин було знайдено ще один тип біфункціонального фермента РФ-кінази. Його особливість в тому, що він містить ФМН-гідролазний домен (Sandoval and Roje, 2005).

РФ-кіназна реакція необоротна. У випадку біфункціональної РФ-кінази/ФАД-синтетази фосфорилування рибофлавіну до ФМН теж є необоротним, тоді як аденілювання ФМН до ФАД оборотне (Efimov et al., 1998). На додаток до забезпечення клітин ФМН, РФ-кіназа може виконувати інші функції. Наприклад, у *Streptococcus agalactiae* ген (*mreA*), що кодує РФ-кіназу, відповідає за стійкість до макролідних антибіотиків (Clarebout et al., 2001).

Архебактерії *M. jannaschii* мають різні РФ-кінази, що не проявляють гомології з РФ-кіназами інших організмів. Архейні ферменти представляють

унікальний клас кіназ, які використовують СТР (цитидин трифосфат) замість АТФ (аденозинтрифосфату) як донора фосфату (Ammelburg et al., 2007; Mashhadi et al., 2008).

ФАД-синтетаза каталізує перенесення аденілільних залишків від АТФ до ФМН (Рис. 1.2 – 11). Інші назви цього фермента – ФАД-пірофосфорилаза, ФМН-аденілтрансфераза, ФМН-аденілілтрансфераза. У рослинних клітинах містяться дві ізоформи фермента і відповідні гени (Sandoval et al., 2008).

У рослин процеси синтезу рибофлавіну складаються з аналогічних стадій, як і у прокаріот. *Arabidopsis thaliana* (гусимка звичайна) стала одним із об'єктів досліджень флавіногенезу. Сегмент геному цієї квіткової рослини зі схожістю до *ribA* гена *B. subtilis* було секвеновано і, в подальшому, експресовано у рекомбінантному штамі *E. coli*. Рекомбінантний білок було очищено і проаналізовано. Показано, що він має активність ГТФ-циклогідролази II, а також активність ДБФ-синтази. Фермент дуже схожий на біфункціональні ортологи з еубактерій; більше того, обидва рослинні білки більше нагадують бактерійні ортологи, ніж ферменти дріжджів. У порівнянні з бактерійним геном *ribA*, ген *Arabidopsis* містить додатковий 5'-елемент, що кодує близько 120 амінокислотних залишків. Цей сегмент не потрібен для каталітичної активності і, ймовірно, слугує сигнальною послідовністю для імпорту в хлоропласти (Herz et al., 2000).

Ще одним фактом на підтвердження подібності синтезу рибофлавіну в рослин та еубактерій є робота рослинної дезамінази, яка перетворює, як і у прокаріотів, продукт ГТФ-циклогідролази II – ДАРПФ. Цвілеві гриби ж використовують іншу послідовність реакцій (Fischer et al., 2004). Крім того, було досліджено четвертинну структуру люмазинсинтази, що імітує ікосаедричну люмазинсинтазу, знайдену в більшості еубактерій (за винятком *Brucella abortus* і *Mycobacterium tuberculosis* (Braden et al., 2000; Morgunova et al., 2005; Zylberman et al., 2006), тоді як дріжджі та гриби утворюють C5-симетричні пентамерні ДМРЛ-синтази.

Щодо структури рибофлавінсинтази рослин, то гомотримерна будова цього білка є подібною до будови цього фермента у прокаріотів та цвілевих грибів. Цікаво, що очищений білок рибофлавінсинтази *A. thaliana*, на відміну від аналогів з інших організмів, має яскраво-жовте забарвлення, що зумовлене нековалентним зв'язуванням молекули рибофлавіну (Fischer et al., 2005).

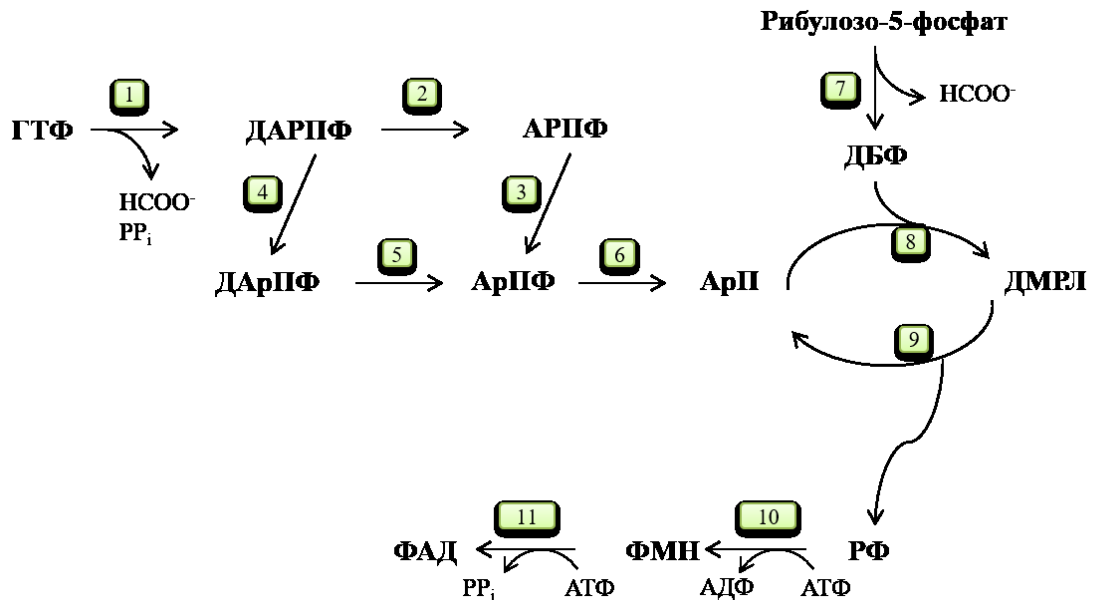


Рис. 1.2. Схема біосинтезу рибофлавіну та флавінових коферментів у мікроорганізмів (відтворено з джерела Fischer and Bacher, 2005); ГТФ – гуанозинтрифосфат, ДАРПФ – 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат, АРПФ – 5-аміно-6-рибозиламіно-2,4(1Н,3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат, ДАрПФ – 2,5-діаміно-6-рибітиламіно-4(3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат, АрПФ – 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1Н,3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат, АрП – 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1Н,3Н)-піримідиндіон, ДБФ – 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат, ДМРЛ – 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин, ФМН – флавінмононуклеотидфосфат, ФАД – флавінаденіндинуклеотид, АТФ – аденозинтрифосфат, АДФ – аденозиндифосфат, 1 – ГТФ-циклогідролаза II, 2 – 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат дезаміназа, 3 – 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат редуктаза, 4 – 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат редуктаза, 5 – 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3Н)-піримідиндіон-5'-фосфат дезаміназа, 6 – неспецифічна дефосфорилаза, 7 – ДБФ-синтаза, 8 – ДМРЛ-синтаза (люмазинсинтаза), 9 – РФ-синтаза, 10 – РФ-кіназа, 11 – ФАД-синтетаза.

У *E. coli* ідентифіковано три локуси, де розташовані структурні гени біосинтезу рибофлавіну (Perkins et al., 1991). У *B. subtilis* виявлено п'ять структурних генів розміщених у послідовності *ribO*, *ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH*, *ribT*, що утворюють оперон на хромосомі цієї бактерії. Оператор *ribO* і головний промотор знаходяться перед структурними генами, а два інших промотори розміщені в дистальній частині кластера. Ген *ribG* кодує біфункціональний білок з дезаміназною та редуктазною активністю. N-кінець білка RibG забезпечує дезаміназну активність, а С-кінець – редуктазну. Ген *ribB* кодує α -субодиницю РФ-синтази, *ribA* – ГТФ-циклогідролазу II, *ribH* – ген, продукт експресії якого забезпечує ДМРЛ-синтазну активність. Метаболічна роль білка RibT залишається невідомою, однак, висунуто припущення, що цей білок не бере участі в біосинтезі рибофлавіну (Richter et al., 1997; Mironov et al., 1989, Perkins et al., 1991, Schott et al., 1990, Ludwig et al., 1987; Ritz, H., G. Richter, and A. Bacher. Unpublished data).

Ферменти, що беруть участь у флавіногенезі *E. coli*, кодуються такими генами: *ribA* – ГТФ-циклогідролаза II; *ribD* – піримідиндеаміназа/піримідинредуктаза; *ribE* – люмазинсинтаза; *ribB* – 3,4-дигідрокси-2-бутанон 4-фосфат синтаза; *ribC* – РФ-синтаза; *ribF* – РФ-кіназа/ФАД-синтетаза (Fischer and Bacher, 2010).

Усі ферменти рибофлавінового шляху рослин містять N-кінцеві сегменти, послідовності яких інтерпретуються як пептиди, властиві хлоропластам. Тому припускають, що біосинтез рибофлавіну відбувається в компартментах хлоропластів (Basset et al., 2002).

1.1.2. Біосинтез рибофлавіну та флавінових коферментів у дріжджів та цвілевих грибів

Варто зауважити, що флавіногенез у дріжджів є досить близьким до відповідного процесу у бактерій і відрізняється порядком дезамінування та відновлення рибози піримідинових інтермедіатів. Вивчення ферментативних процесів утворення рибофлавіну у *Ashbya gossypii* – цвілевого гриба, дуже

подібного за природою до дріжджів, також показало, що реакція відновлення передуює дезамінуванню. Таким чином, процес флавіногенезу у цих організмів нагадує той, який, як вважають, функціонує у дріжджів (Hollander and Brown, 1979).

Серед дріжджів біосинтез рибофлавіну найкраще та вперше вивчений у двох видів – *Pichia guilliermondii* та *S. cerevisiae*. Пізніше, завдяки знанням про флавіногенез та про структурні гени, що кодують відповідні ферменти реакцій у дріжджів *P. guilliermondii*, вдалося дослідити цей процес та ізолювати гени дріжджів *C. famata* (Dmytruk et al., 2004). Цей процес відбувається за участі шістьох ферментів. Перший з них – ГТФ-циклогідролаза II (кодується геном *RIB1*). Як вже було описано для еубактерій, цей фермент перетворює ГТФ у ДАРПФ, відщеплюючи від молекули форміат та пірофосфат. Наступний фермент – 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3Н)-піримідинон-5'-фосфат редуктаза (*RIB2*) каталізує відновлення рибози, і саме ця послідовність реакцій є характерною для дріжджів та цвілевих грибів (Рис. 1.2 – 4). Реакція дезамінування каталізується 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3Н)-піримідинон-5'-фосфат дезаміназою (*RIB3*) та веде до утворення АрПФ (Рис.1.2 – 5) (Bacher et al., 1997; Shavlovskii et al., 1979; Shavlovsky et al., 1980; Dmytruk et al., 2004).

Наступний етап є важливим, але досі погано вивченим. Це дефосфорилування АрПФ й утворення АрП за допомогою неспецифічної фосфатази (*RIB4*). З цього моменту шляхи синтезу рибофлавіну у дріжджів, грибів, прокаріот та рослин знову мають однакову послідовність перетворень (Keller et al., 1988; Dmytruk et al., 2004).

Фермент ДБФ-синтаза каталізує перетворення рибулозо-5-фосфату в ДБФ (*RIB6*). ДБФ вступає у реакцію конденсації з АрП за участю ДМРЛ-синтази (*RIB5*) (Рис. 1.2 – 8) (Fischer et al., 2005). Продукт цієї реакції ДМРЛ, у свою чергу, перетворюється, в рибофлавін в реакції, каталізованій РФ-синтазою (*RIB7*). При цьому вивільняється молекула АрП, що повертається на попередню стадію синтезу для конденсації (Рис. 1.2 – 9) (Santos et al., 1995; Volk and Bacher, 1990; Logvinenko et al., 1984; Dmytruk et al., 2004).

У дріжджів синтез ФМН відбувається за допомогою ферментів, дослідження структури яких, а саме РФ-кіназ у *Schizosaccharomyces pombe*, показали наявність окремої родини ферментів, що переносять фосфатну групу. Еукаріотичні РФ-кінази характеризуються схожими амінокислотними послідовностями з відповідними ділянками у послідовностях РФ-кінази біфункціональних ферментів з еубактерій (Bauer et al., 2003; Abbas and Sibirny, 2011).

ФАД синтезується за участю ФАД-синтетази. У дріжджів, на відміну від бактерій, виявлено лише монофункціональний фермент, що має лише одну ізоформу (Wu et al., 1995).

1.2. Генетичний контроль біосинтезу рибофлавіну у мікроорганізмів

1.2.1. Регуляція флавіногенезу на рівні транскрипції у бактерій

Серед шляхів регуляції біосинтезу рибофлавіну відомо такий як регуляція RFN елементів (ФМН-рибосвічів). Вони характерні для багатьох класів еубактерій, деяких архебактерій та еукаріот. Ці структури є залучені у регуляцію багатьох оперонів чи окремих генів, що беруть участь у біосинтезі вітамінів та коферментів (рибофлавіну, тіаміну, пірофосфату, S-аденозил-L-метіоніну) та деяких інших сполук (Barrick and Breaker, 2007). Рибосвічі є найпоширенішим типом 5'-нетрансляційних регіонів прокаріотичних мРНК, що кодують ферменти синтезу ФМН. Рибосвічі можуть зв'язувати малі ефекторні молекули без участі білків-регуляторів. Тобто вони використовують лише селективні зв'язуючі домени (ліганд-зв'язуючі кишені або аптамери). Характеристики деяких рибосвічів свідчать про те, що вони могли бути сучасними нащадками стародавньої сенсорної та регуляторної системи, яка, ймовірно, функціонувала до появи ферментів і генетичних факторів (Breaker, 2006; Barrick and Breaker, 2007; Breaker, 2010; Vitreschak et al., 2002; Nahvi et al., 2002).

Рибосвіч складається з невпорядкованих ділянок молекули в регуляторному сегменті мРНК, що стають структурованими внаслідок

зв'язування метаболіту. Також це може призвести до структурних перебудов поза центром зв'язування, у результаті чого формується набір шпильок, які можуть інгібувати транскрипцію, а також блокувати приєднання до мРНК рибосом, тобто зупиняти ініціацію трансляції (Barrick and Breaker, 2007). Крім інгібування певних шляхів біосинтезу, рибосвічі також виконують роль активації шляхів деградації чи транспорту цих молекул за умов їх надлишку.

Регуляція синтезу рибофлавіну у бактерій була детально досліджена на прикладі *B. subtilis*. У цих мікроорганізмів виявлено оперон, що містить п'ять генів – *ribGBAHT*, які відповідають за синтез ферментів, що беруть участь у біосинтезі вітаміну В₂. Цей оперон транскрибується як єдина молекула – поліцистронна РНК розміром близько 4300 пар нуклеотидів (п.н.) (Mironov et al., 1994). мРНК цього оперону також містить ділянку *ribO* довжиною приблизно 300 п.н., що не транслюється (Mironov et al., 1990). Проте мутації в цій ділянці приводили до надсинтезу рибофлавіну (Kil et al., 1992). Жодного гена білка-репресора, що міг би зв'язуватися з цією послідовністю знайдено не було.

Дослідження допомогли виявити гени *ribC* та *ribR*, які кодують ферменти біфункціональну РФ-кіназу/ФАД-синтазу та монофункціональну РФ-кіназу, відповідно. Цікаво те, що доведено позитивний вплив мутацій у цих генах на надсинтез рибофлавіну, хоча вони не включені до рибофлавінового оперону (Gusarov et al., 1997; Mack et al., 1998; Solovieva et al., 1999). Також додавання до середовища культивування таких мутантів екзогенного ФМН інгібує синтез рибофлавіну (Lee et al., 1994). Нуклеотидна послідовність лідерної ділянки *rib*-оперону є консервативною і РНК в цій ділянці формує структуру RFN-елемент довжиною 140 п.н. Цей комплекс може зв'язуватися з молекулою ФМН, що призводить до конформаційних змін в молекулі РНК та формування термінаторної шпильки, що веде до атенуації транскрипції. За відсутності ФМН, конформація RFN-елемента формує антитермінаторну структуру, що забезпечує нормальну транскрипцію усього оперону. Таким чином, RFN-елемент виконує функцію рецептора в клітині для відстеження рівня флавінів

та є природним аптамером, алостеричний характер якого використовується для контролю експресії генів (Mironov et al., 2002; Winkler et al., 2002). Схожі елементи було виявлено не лише в *B. subtilis*, а й у інших бактерій (Vitreschak et al., 2002). Для ефективного зв'язування ФМН необхідні іони Магнію та Калію (Barrick and Breaker, 2007).

У бактерій *E. coli* рибосвіч здатний пригнічувати не тільки транскрипцію, а й трансляцію РНК, за рахунок формування відповідних структур, що перешкоджають ініціації трансляції (Vitreschak et al., 2002). На відміну від рибосвічів із механізмами контролю транскрипції, які вимагають дуже специфічних термінаторних структур у їхніх платформах експресії, структури РНК, які запобігають ініціації трансляції, можуть бути більш різноманітними.

Ген *ribBA Helicobacter pylori*, що кодує біфункціональну ГТФ-циклогідролазу II/3,4-дигідроксибутанонфосфат-синтазу, дерепресується в умовах дефіциту Заліза, що призводить до посилення синтезу флавінів. Гетерологічна експресія цього гена в *E. coli* привела до двократного збільшення синтезу рибофлавіну та активності фериредуктази (Worst et al., 1998).

Флавіни беруть участь у люмінесценції бактерій. У *Photobacterium phosphoreum* і *Photobacterium leiognathi* гени біосинтезу рибофлавіну пов'язані з опероном люциферази (*lux*) і транскрибуються як одна поліцистронна мРНК (Lee and Meighen, 1992; Lee et al., 1994; Lin et al., 2001). У інших люмінесцентних видів, наприклад, *Vibrio fischeri*, незв'язаний ген *ribB*, гомологічний гену *E. coli*, що кодує ДБФ-синтазу, утворює спільний регулон з опероном *lux* (Callahan and Dunlap, 2000). Бактерії *Clostridium acetobutylicum* здатні надпродукувати рибофлавін в умовах дефіциту заліза (Hickey, 1945), але механізм регуляції залишається нез'ясованим.

1.2.2. Регуляція біосинтезу рибофлавіну на рівні транскрипції у флавіногенних дріжджів

Як було згадано вище, флавіногенними вважають групу штамів дріжджів, що надпродукують рибофлавін в умовах дефіциту заліза (Tanner et al., 1945).

Серед відомих представників цієї групи *P. guilliermondii*, *C. famata* (або анаморфна форма *Candida flareri*, телеоморфна – *Debaryomyces subglobosus*), *Debaryomyces hansenii*, *Schwanniomyces occidentalis*, патогенний штам дріжджів *C. albicans* та інші (Knight et al., 2002; Groenewald et al., 2008; Nguyen et al., 2009; Sibirny, 1996; Sibirny and Boretsky, 2009; Sibirny and Voronovsky, 2009; Wang et al., 2008). Іони Феруму і флавіни, як відомо, є кофакторами окисно-відновних ферментів, зокрема тих, що залучені у функціонування дихального ланцюга. Однак було вивчено, що залізовмісні негемові білки початкового сегмента дихального ланцюга не беруть участь у регуляції біосинтезу рибофлавіну у дріжджів. Показано, що дихальна система залізодефіцитних клітин *P. guilliermondii* залишається типовою цитохромною системою з аутооксидабельним ціанідрезистентним шляхом (Звягильська та ін., 1978).

Малі кількості утворених флавінів мікроорганізмами при високому вмісті заліза в середовищі свідчить про функціонування ефективних механізмів, що обмежують синтез флавінів у клітинах. Одним із таких механізмів є ретроінгібування ГТФ-циклогідролази II, що виявлено у дріжджів *P. guilliermondii* в дослідях *in vivo* та *in vitro* (Шавловський та ін., 1974; Shavlovskii et al., 1978; Shavlovsky et al., 1976). В умовах недостатнього забезпечення дріжджів залізом посилюється експресія всіх структурних генів флавіногенезу, окрім гена *RIB2*, який експресується конститутивно, і дерепресується утворення відповідних ферментів, а саме, ГТФ-циклогідролази II, дезамінази, ДМРЛ-синтази, ДБФ-синтази і РФ-синтази. Це супроводжується надсинтезом рибофлавіну (Shavlovskii, and Logvinenko, 1988). Отже, між флавіногенною активністю дріжджів та рівнем дерепресії цих ферментів виявлено позитивну кореляцію. Також дерепресії згаданих ферментів і стимуляції біосинтезу рибофлавіну досягали при інкубації клітин флавіногенних дріжджів з $\alpha\alpha'$ -дипіридилем, о-фенантроліном і 8-оксихіноліном, хелатуючими сполуками з високою спорідненістю до іонів заліза. В таких умовах інгібітор транскрипції – антиміцин D, майже повністю пригнічував дерепресію ГТФ-циклогідролази II та РФ-синтази у мутантів *P.*

guilliermondii та *Torulopsis candida* (Logvinenko et al., 1982; Trach et al., 1982). Припускають, що синтез ферментів, задіяних у процесі утворення рибофлавіну у флавіногенних дріжджів, перебуває під негативним контролем білка-репресора, для прояву активності якого необхідна наявність корепресора – заліза (Бабяк та ін., 2001). Деякі роботи допомагають надати певні загальні характеристики цього гіпотетичного залізовмісного регуляторного білка. У мутантів *P. guilliermondii* з блокованим синтезом δ -амінолевулінової кислоти дефіцит гему не викликав надсинтезу рибофлавіну і дерепресії РФ-синтази, отже, гемінове залізо не може входити до складу репресора (Shavlovskii and Laska, 1973). Цей білок є залізофлавопротеїном, адже дефіцит флавінів у флавінзалежних мутантів дріжджів не викликав дерепресії ферментів біосинтезу рибофлавіну. Комплекс заліза з білком відносно легко дисоціює (Logvinenko et al., 1973).

Остаточні і вичерпні причини стимуляції продукції рибофлавіну у умовах дефіциту заліза досі з'ясовуються. Одна із думок – пряма роль рибофлавіну як донора електронів для відновлення заліза.

Вміст заліза не впливає на синтез ферментів, що залучені у перетворення рибофлавіну у флавінові коферменти. Дерепресія інших генів відбувається на рівні транскрипції, оскільки за умов дефіциту іонів Феруму спостерігається значне зростання кількості мРНК генів *RIB1* та *RIB7* (Boretsky et al., 2005).

На підтвердження теорії про негативний контроль флавіногенезу білком-репресором було розроблено методи селекції мутантів з пошкодженою регуляцією біосинтезу рибофлавіну. Селекціоновано три класи мутантів *P. guilliermondii* із пошкодженими регуляторними генами негативного типу дії – *RIB80*, *RIB81*, *HIT*. Проте для дріжджів властиві не тільки негативні фактори регуляції експресії генів, то ж досліджували й позитивний тип дії регуляторів на флавіногенез. Отримано також два класи мутантів з пошкодженими генами позитивного типу дії *RIB83*, *RIB84*. Мутанти *rib80*, *rib81* і *hit* нагромаджують значні кількості рибофлавіну у середовищі з високим вмістом заліза (Shavlovskii et al., 1985a; Shavlovskii et al., 1985b; Stenchuk et al., 1991;

Shavlovskii et al., 1989). Нестача заліза в середовищі вирощування сприяє ще більшому підвищенню флавіногенної активності отриманих штамів.

Мутанти *rib83* і *rib84* не здатні до надсинтезу рибофлавіну навіть за умов дефіциту іонів Феруму, що дозволяє робити висновки про те, що гени *RIB83* та *RIB84* у штамів дикого типу контролюють утворення регуляторних елементів позитивного типу дії (Баб'як та ін., 2001). Генетичний аналіз мутацій довів, що мутації *rib80*, *rib81* та *hit* є ядерними, рецесивними і комплементують одна одну. Аналіз властивостей отриманих мутантів з пошкодженою регуляцією біосинтезу рибофлавіну показав, що попередньо згадані мутації у генах *RIB80*, *RIB81* та *HIT* мають плейотропну дію (Shavlovskii et al., 1992; Shavlovskii et al., 1993; Федорович та ін., 1992). Вплив делеції цих генів на синтез ферментів флавіногенезу доповнюється здатністю цих мутацій стимулювати поглинання заліза і нагромадження його в клітинах. На відміну від клітин дикого типу, які містять залізо у вигляді двовалентного Феруму, в клітинах мутантів *rib80*, *rib81* та *hit* майже половина акумульованого заліза знаходиться у вигляді тривалентного Феруму (Fedorovich et al., 1997). При цьому, клітини володіють високою активністю фериредуктази (Fedorovich et al., 1997). Найвищу швидкість відновлення тривалентного Феруму з різних комплексів мають клітини *hit* мутантів. Виявилося, що у цих штамів також підвищується активність феріоксидази – ще одного фермента системи транспорту заліза (Федорович та ін., 1992).

Отже, продукти трьох генів негативного типу дії *RIB80*, *RIB81* та *HIT* беруть участь в регуляції двох процесів: транспорту заліза і біосинтезу рибофлавіну. Вважають, що спільні механізми постачання клітин кофакторами – флавінами та іонами Феруму, можуть бути важливими для функціонування дихального ланцюга дріжджів. Не лише описані вище механізми беруть участь в регуляції забезпечення клітин дріжджів такими кофакторами, як флавіни та залізо. Залишається нерозкритим питання як саме гіпотетичний регуляторний репресор взаємодіє з промоторними ділянками структурних генів біосинтезу

рибофлавіну та генів, що контролюють окремі етапи транспорту заліза (Бабяк та ін., 2001).

У *S. famata* отримано мутанти, що втратили здатність до надинтезу рибофлавіну. Цього було досягнуто методом інсерційного мутагенезу. У одного з таких мутантів інсерційна касета інтегрувалася в ділянку промотора гена *RIB1*. У іншого штама інтеграція відбулася в ділянку гомолога гена *MET2*, що бере участь у синтезі метіоніну. У третьому інтеграція пройшла в гені *SEF1* (Dmytruk et al., 2006).

Ген *SEF1* було виявлено у 1998 році при вивченні функції гену *RPM2* *S. cerevisiae* та *Kluyveromyces lactis*, який кодує пептид, що є субодиницею мітохондріальної РНКазы Р у дріжджів, яка залучена у дозріванні 5'-кінця мітохондріальної тРНК. Мутації цього гена призводять до того, що клітини втрачають здатність рости на середовищі з неферментативними джерелами Карбону. Проте було виявлено ген, який компенсує нездатність рости на середовищі з гліцеролом або етанолом при делеції гену *RPM2*, але не відновлює РНК-зної активності. Цей ген отримав назву *SEF1*, що розшифровується як Suppressor of the Essential Function. Продукт цього гену містить Zn(2)-Cys(6) ДНК-зв'язуючий домен («цинковий палець»), що є характерним для багатьох транскрипційних факторів. У *S. famata* цей ген також пов'язаний з біосинтезом рибофлавіну, а саме є позитивним регулятором. Експресія *SEF1* підвищується в умовах недостатнього постачання іонів Феруму в клітини, що свідчить про ауторегуляцію експресії гена. Проте у нефлавіногенних дріжджів *S. cerevisiae* експресія гену *SEF1* залізом не регулюється (Groom et al., 1998). Щодо нефлавіногенних дріжджів *S. stipitis*, то експресія гена *SEF1* у них є нижча порівняно з іншими видами дріжджів, але за умов дефіциту заліза відбувається зростання рівня експресії *SEF1*, подібно до флавіногенних дріжджів *C. famata*. Одним із можливих пояснень є те, що і *S. stipitis*, і *C. famata* належать до групи дріжджів з зміненою трансляцією CUG-кодона і Sef1 може мати у них деякі спільні функції (неопубліковані дані, Лизак О.О.). Промисловий штам *C. famata*

der8 має конститутивно дерепресований *SEF1*, який не залежить від вмісту заліза (Abbas and Sibirny, 2011).

Кодуючі послідовності *SEF1* у флавіногенних і нефлавіногенних видів дріжджів дуже схожі, тому припускають, що нездатність *SEF1* гену з *S. stipitis* відновлювати надпродукцію рибофлавіну у *sef1 C. famata* залежить від його низької конститутивної експресії. *SEF1* може відігравати центральну роль у регулюванні синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджах, але механізм його дії ще належить з'ясувати (Abbas and Sibirny, 2011).

SEF1 бере участь у регуляторній системі гомеостазу Феруму в *C. albicans*, патогенних флавіногенних дріжджах зі слабким потенціалом до надсинтезу рибофлавіну. Ця система включає два додаткових фактори транскрипції: Sfu1 і Nar43. Sfu1 пригнічує експресію *SEF1* і поглинання Феруму; однак, Nar43, в свою чергу, інгібує *SFU1*, і експресія активується дією Sef1. *RIB1* знаходиться під позитивним контролем *SEF1* у *C. albicans* так, як це відбувається в *C. famata* (Chen et al., 2011).

Молекулярний підхід з нокаутом гена гомолога дріжджового фратаксину *YFH1*, що кодує мітохондріальний білок, який бере участь у транспортуванні та акумулюванні заліза, дозволив отримати ще один мутант *P. guilliermondii* із надлишковою продукцією рибофлавіну (Babcock et al., 1997; Santos et al., 2004). Отриманий мутант *yfh1*, як і мутанти, виділені за допомогою звичайного мутагенезу, надпродукував рибофлавін у багатому залізом середовищі, мав підвищений внутрішньоклітинний вміст заліза та був гіперчутливим до окислювального стресу.

На дріжджах *P. guilliermondii* було отримано мутант *Δvma1-17*. Проаналізовано, що такий штам має знижений вміст заліза в клітинах і підвищену чутливість до H_2O_2 . Схожі властивості проявляв штам *S. cerevisiae* позбавлений вакуольної АТФази (Milgrom et al., 2007). Крім того, цей штам надмірно продукував рибофлавін (у п'ять – сім разів більше, ніж вихідний штам). *Δvma1-17* має чутливий до температури фенотип. Мутант не може рости

при 37°C, тоді як батьківський штам добре росте в тих же умовах (Boretsky et al., 2011).

1.2.3. Регуляція біосинтезу рибофлавіну на рівні транскрипції у цвілевих грибів

Серед цвілевих грибів відомі види – надсинтетики рибофлавіну, а саме *E. ashbyii* (Guilliermond et al., 1935) та *Eremothecium (Ashbya) gossypii* (Wickerham et al., 1946). *E. ashbyii*, зокрема, характеризуються також тим, що здатні до надсинтезу кофактора ФАД (Yagi et al., 1956). Надсинтез рибофлавіну у цих організмів збігається з початком споруляції. Фізіологічні причини для такої залежності є нерозкритими, хоча ці процеси є пов'язані, адже у мутантів *A. gossypii*, які втратили здатність до споруляції, спостерігається зменшення рівня синтезу рибофлавіну (Cerletti et al., 1965). А циклічний АМФ (цАМФ) здатен інгібувати як продукцію рибофлавіну, так і споруляцію (Stahmann et al., 2001). Крім того, відомо, що рибофлавін захищає спори від дії ультрафіолетового випромінювання (Stahmann et al., 2001). Ймовірно, що жовтий пігмент рибофлавін, який виробляється під час спороношення *E. ashbyii* та *A. gossypii*, приваблює комах-переносників, які поширюють їхні спори на нові рослини (Sibirny, 1996).

Зниження рівня поживних речовин приводить до надсинтезу рибофлавіну і процесу спороутворення у флавіногенних грибів. Було показано, що за умов нестачі необхідних метаболітів відбувається активація генів *RIB3*, *RIB4*, *RIB5*, але не *RIB2*, *RIB7*. За умов культивування в середовищі з постійним доступом поживних речовин цвілеві гриби перебувають лише у вегетативній стадії росту, що супроводжується відсутністю спороутворення, а отже, й надсинтезу рибофлавіну (Karos et al., 2004; Mateos et al., 2006; Schlösser et al., 2001; Schlösser et al., 2007).

Флавіногенна активність *A. gossypii* залежить від температури культивування і значно знижується вже при 38°C. Було висловлено гіпотезу, що за підвищеної температури активується специфічний репресор біосинтезу

рибофлавіну, хоча прямих доказів надано не було (Demain, 1972). У *E. ashbyii* перехід від фази росту до фази продукування рибофлавіну супроводжувався дерепресією ГТФ-циклогідролази II та ФАД-синтетази, тоді як активність РФ-синтази була лише незначно змінена (Koltun et al., 1984).

Природа месенджерів, що індукують надсинтез рибофлавіну, залишається невідомою. Було припущено, що певні стресові фактори, які накопичуються під час припинення росту, сприяють активації транскрипції та продукції рибофлавіну (Schlösser et al., 2007).

Для грибів *A. gossypii* показано, що пошкодження гена *IMA1*, що кодує вакуолярну субодиницю АТФази А, веде до повного виведення рибофлавіну у культуральне середовище при рості на глюкозі та соєвих середовищах. Дикий тип *A. gossypii*, як відомо, накопичує вітамін В₂ у своєму вакуолярному компартменті (Förster et al., 1999).

1.3. Пентозофосфатний шлях та його функції у синтезі рибофлавіну

Пентозофосфатний шлях (ПФШ) – це шлях перетворення глюкози, який працює в більшості живих клітин паралельно з гліколізом. Він включає окислювальний етап, в якому діє Г6ФДГ (глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа) як ключовий фермент, що генерує НАДФН, і неокислювальну частину, що включає оборотні реакції транскетолази та трансальдолази, які обмінюють метаболіти ПФШ з гліколізом. Хоча окислювальна стадія є життєво важливою для боротьби з окислювальним стресом, неокислювальна стадія забезпечує утворення попередників для синтезу нуклеїнових, жирних кислот та ароматичних амінокислот (Bertels et al., 2021).

Каталітична реакція за участі глюкозо-6-фосфат дегідрогенази є першою, що забезпечує генерацію НАДФН і, таким чином, підтримує відновлювальну потужність для синтезу жирних кислот і ліпідів, а також відновлення глутатіону, необхідного для детоксикації активних форм Оксигену (Bertels et al., 2021). У *S. cerevisiae* активний фермент, схоже, є тетрамером, дисоціація якого на димери та зниження активності може бути викликана НАДФН (Levy,

1979). Субодиниці тетрамера кодуються геном *ZWF1*, який був клонований з гаплоїдного геному дріжджів (Heinisch et al., 2020; Juhnke et al., 1996; Nogae and Johnston, 1990; Thomas et al., 1991; Lee et al., 1999). Тим не менш, експресія гена *ZWF1* є конститутивною. Ретельний біохімічний аналіз показав, що конформаційні переходи, викликані заміною НАДФ⁺ на НАДФН в алостеричному центрі субодиниць, викликають роз'єднання тетрамерного активного ферменту і утворення димерів, що призводить до пригнічення його активності (Saliola et al., 2012).

Г6ФДГ каталізує утворення 6ФГЛ (6-фосфоглюконолактону), який, як вважалося, спочатку спонтанно перетворюється на 6ФГ (6-фосфоглюконат). Однак геном *S. cerevisiae* містить чотири ймовірних гени 6-фосфоглюконолактаз, названих *SOL1* – *SOL4*. Таким чином, запропоновано, що Sol3 і Sol4 функціонують в ПФШ, тоді як Sol1 і Sol2 беруть участь у експорті ядерної тРНК (Stanford et al., 2004).

Ще одна молекула НАДФН утворюється в окисному етапі ПФШ під дією 6-фосфоглюконатдегідрогенази (6ФГД). Одночасно вуглець С1 з глюкози видаляється шляхом декарбоксилювання, утворюючи рибулозо-5-фосфат (Ру5Ф), який потрапляє в неокислювальний етап ПФШ (Stanford et al., 2004). Проте Ру5Ф є не лише першим субстратом неокиснювальної гілки ПФШ. Головна роль Ру5Ф – участь, як структурного компонента, в біосинтезі РНК і далі, після перетворення до 2-дезоксирибозо-5-фосфату – в ДНК. Ця молекула відіграє ще одну важливу роль у клітинах багатьох організмів, а саме – слугує одним із двох попередників рибофлавіну. Відгалуження від ПФШ відбувається за участю фермента ДБФ-синтази, що забезпечує перетворення Ру5Ф в ДБФ, що далі вступає в реакцію конденсації АрП.

Другий етап ПФШ починається з ізомеризації рибулозо-5-фосфату і полягає в ізомерних перетвореннях фосфатних естерів вуглеводів. Ізомеризація шести молекул рибулозо-5-фосфату шляхом його перетворення в чотири молекули ксилулозо-5-фосфату відбувається за допомогою фермента фосфопентоепімерази, а в дві молекули рибозо-5-фосфату –

фосфопентоізомерази. Метаболіти, які беруть участь у неокиснювальній фазі ПФШ, як субстрати або продукти, також залучені в інших шляхах. Цей зв'язок з іншими метаболічними шляхами є підставою вважати, що неокиснювальний етап ПФШ відіграє центральну роль у метаболізмі. Наприклад, гліцеральдегід-3-фосфат і фруктозо-6-фосфат є проміжними продуктами гліколізу і пов'язані з другим етапом ПФШ, а еритрозо-4-фосфат є продуктом неокиснювального етапу і водночас попередником шляху шикімату. Цей шлях використовується клітинами бактерій, архей, грибів, водоростей та деякими рослинами для біосинтезу фолатів і ароматичних амінокислот (триптофану, фенілаланіну і тирозину). Еритрозо-4-фосфат є також попередником вітаміну В₆ та вітаміну К. ПФШ також є «станцією» утворення рибозо-5-фосфату, що служить попередником для синтезу нуклеотидів та нуклеїнових кислот. Ці зв'язки між ПФШ та іншими біохімічними шляхами можуть вимагати динамічної регуляції залучених ферментів (Stinson et al. 2015).

ПФШ виконує три основні функції: збільшення відновних еквівалентів клітини за рахунок виробництва НАДФН; утворює пул рибозо-5-фосфату, який є попередником для біосинтезу нуклеотидів і синтезує еритрозо-4-фосфат, попередник для біосинтезу ароматичних амінокислот. ПФШ також зумовлює синтез і деградацію чотирьох-, п'яти- і семивуглецевих цукрів. Враховуючи таку важливу роль у метаболізмі вуглецю, не дивно, що ПФШ вважають одним із найбільш цільових шляхів у метаболічній інженерії. Розуміння регуляції процесів ПФШ є дуже корисним для розробки шляхів метаболічної інженерії (Masi et al., 2021).

1.4. Конструювання поліпшених продуцентів рибофлавіну у дріжджів

Шлях біосинтезу рибофлавіну у дріжджів забезпечується роботою сімох основних ферментів описаних у розділі 1.1.2, кожен з яких закодований відповідним геном. Результати низки досліджень щодо регуляції експресії генів, що так чи інакше залучені у процес біосинтезу рибофлавіну у мікроорганізмів, зокрема дріжджів, узагальнені в оглядах (Abbas and Sibirny,

2011; You et al., 2021; Averianova et al., 2020). Нефлавіногенні дріжджі *Pichia pastoris* було досліджено на предмет можливості підвищеної продукції рибофлавіну при внесенні модифікацій в експресію генів цього шляху. Виявлено, що гетерологічна експресія гена гомолога *RIB1* із *S. cerevisiae*, та гомологічна експресія *RIB1* (кодує фермент ГТФ-циклогідролазу II) у *P. pastoris* під контролем GAP (GTPase Activating Protein – ГТФ-аза активуючий білок) промотора дозволила підвищити вихід рибофлавіну до 3,9 мг/л та 3,0 мг/л, відповідно. Шляхом надекспресії кожного гена шляху флавіногенезу окремо та разом було встановлено, що всі вони мають регуляторний вплив на синтез рибофлавіну, тоді як *RIB1* є важливим стимулятором цього шляху. Посилена експресія *RIB3* і *RIB7* (кодують ДБФ-синтазу та редуктазу, відповідно), як наступні кроки у ранніх етапах роботи обох гілок рибофлавінового шляху, можуть ще більше посилити синтез рибофлавіну при сумісній експресії з *RIB1*, тоді як надекспресія генів пізніх етапів шляху не мали впливу разом з *RIB1*, що вказує на те, що контроль над *RIB3* і *RIB7* обмежують потік так, що дерегуляція пізніх генів не може стати ефективною. Досліджували також експресію всіх генів *RIB* під контролем конститутивного гомологічного промотора GAP. Почергова дерегуляція всіх шести генів *RIB* привела до того, що штам продукував 175 мг/л рибофлавіну, що в 3,5 рази більше, ніж штам з надекспресією одного гена *RIB1* (Marx et al., 2008).

Для вдосконалення синтезу рибофлавіну, до штама-надпродуцента *C. famata* AF-4, отриманого шляхом класичного мутагенезу, було застосовано раціональні підходи метаболічної інженерії. Враховуючи те, що транскрипційний фактор Sef1 бере участь у позитивній регуляції синтезу рибофлавіну в *C. famata*, було вирішено інтегрувати додаткову копію цього гена у штам AF-4 (описано: Dmytruk et al., 2006). Було здійснено гетерологічну експресію гена ортолога *SEF1* *D. hansenii*, що дозволило збільшити вихід рибофлавіну у 1,9 разів порівняно із вихідним штамом. Досліджено вплив надекспресії *IMH3* (ген, що кодує фермент, що лімітує швидкість синтезу ГТФ *de novo*) на синтез рибофлавіну. Для цього порівнювали продукцію

рибофлавіну у штамів AF-4, AF-4/*IMH3*, AF-4/*SEF1*, AF-4/2x*SEF1* та AF-4/*SEF1/IMH3*. Штам AF-4/*IMH3* мав 1,6-кратне збільшення продукції рибофлавіну, тоді як експресія *IMH3* разом із додатковою копією *SEF1* мала незначний ефект порівняно з додатковою копією окремо *SEF1*. Значного додаткового збільшення продукції рибофлавіну досягнуто шляхом маніпуляції зі структурними генами, які беруть участь у синтезі рибофлавіну. Надекспресія генів ферментів першої та останнього шляху синтезу рибофлавіну призвела до 1,4- та 1,3-кратного підвищення продукції у AF-4/*RIB1/RIB7* та AF-4/2x*SEF1/IMH3/RIB1/RIB7* у порівнянні з відповідними батьківськими штамми AF-4 і AF-4/2x*SEF1/IMH3*, відповідно (Dmytruk et al., 2011).

Штам *C. famata* L20105 (*leu2*) (Voronovsky et al., 2002) було використано для виявлення впливу генів *RIB1*, *RIB6* та *RIB7* (кодують ГТФ-циклогідролазу II, ДБФ-синтазу, РФ-синтазу) на продукцію рибофлавіну. Як і в попередньо описаній роботі, підтвердилася закономірність, що у штамів, у яких надекспресовано поодинокі гени флавіногенезу, найвищого збільшення виходу рибофлавіну було досягнуто для штаму з надекспресією ГТФ-циклогідролази II - L20105/*RIB1*. Цей рівень сягнув 47% збільшення у порівнянні з вихідним штамом L20105. Інші ж мутанти, L20105/*RIB1*, L20105/*RIB6*, L20105/*RIB7*, L20105/*RIB1-RIB6*, L20105/*RIB1-RIB7*, L20105/*RIB6-RIB7* і L20105/*RIB1-RIB6-RIB7* виявили 47%, 18%, 7%, 100%, 57%, 22% і 47% збільшення виходу рибофлавіну (мг рибофлавіну на г сухої ваги клітин) відповідно, порівняно з вихідним штамом L20105.

Комбінована надекспресія генів *RIB1* та *RIB7* дозволила покращити вихід рибофлавіну на 33% якщо порівняти з вихідними штамми-надпродуцентами AF-4 (Dmytruk et al., 2011) та AF-4/*SEF1/RIB1/RIB7* (у штаму, позначеного як BRP – Best Riboflavin Producer) (Dmytruk et al., 2014). Цікаво відзначити, що спільна експресія генів *RIB1* і *RIB7* виявила більш виражене збільшення виходу рибофлавіну на штам дикого типу, а не на потужніших продуцентів рибофлавіну. Цей факт можна пояснити іншими лімітуючими стадіями синтезу рибофлавіну, коли кількість виробленого вітаміну значно збільшується. Серед

них, наприклад, достатній запас попередників для синтезу вітаміну B₂ або ефективного вивільнення рибофлавіну з клітини. Нещодавно було доведено суттєву роль постачання пуринових нуклеотидів для надлишкової продукції вітаміну B₂ (Dmytruk et al., 2020), однак роль іншої молекули-попередника, Py5Ф, у надсинтезі рибофлавіну у *C. famata* залишається невідомою (Abbas and Sibirny, 2011; Dmytruk and Sibirny, 2012), і планується з'ясувати в подальших дослідженнях.

Окрім того, досліджено роль певних стадій біосинтезу пуринів на забезпечення флавіногенного шляху пуриновими попередниками. З'ясовано, що продукти генів *PRS3m* та *ADE4m* (фосфорибозилфосфатсинтетаза та фосфорибозил фосфатамідотрансфераза) є більш важливими для надпродукції рибофлавіну, ніж середні ланки, що працюють, зокрема, завдяки роботі інозин-5'-монофосфатдегідрогенази, кодованої геном *IMH3*. Для такого аналізу авторами було використано чужорідні гени *PRS3* та *ADE4* дріжджів *D. hansenii*. Щоб уникнути зворотного інгібування ферментів, у якому, як було показано для грибів *A. gossypii*, брали участь висококонсервативні амінокислотні залишки (Jiménez et al., 2005; 2008), ці залишки було змінено у відповідних ферментах *D. hansenii*. Таким чином, строго консервативні залишки лейцину 132 і гістидину 195 білка Prs3 були замінені на ізолейцин 132 і глутамін 195, щоб уникнути інгібуючого ефекту АДФ. Амінокислотні залишки аспарагінової кислоти 315, лізину 338 і аланіну 422 білка Ade4 замінили на валін 315, глутамін 338 і триптофан 422 для подолання пригнічення молекулами АТФ і ГТФ. Сконструйовані гени *PRS3m*, *ADE4m* були клоновані під контролем сильного конститутивного промотора гена *TEF1* *C. famata*.

Надекспресія *PRS3* або *ADE4* привела до досить слабкого збільшення продукції рибофлавіну, порівняно з рівнем синтезу, отриманим у штамів з подвійною гіперекспресією. Відповідний штам проявляв збільшення виходу вітаміну у два рази порівняно з вихідним штамом BRP. Вплив надекспресії гена *IMH3* на продукцію рибофлавіну у BRP був незначним у порівнянні з сумісною експресією генів *PRS3m* і *ADE4m*, а саме – у 1,03 рази (Dmytruk et al., 2020).

У флавіногенних дріжджах *D. hansenii* та *C. famata* було ідентифіковано декілька гомологів гена *BCRP* (breast cancer resistance protein) ссавців, що кодує екскретазу рибофлавіну. Найближчі гомологи цього фермента з *D. hansenii* та *C. famata* були експресовані під контролем промотора *TEF1* цих дріжджів у штаммах *C. famata* дикого типу та надпродуцентах рибофлавіну. Отримані мутанти надекспресували відповідні гени (позначені як *DhRFE* і *CfrFE* (RiboFlavin Excretase)) і продукували в 1,4 – 6 разів більше рибофлавіну в порівнянні з відповідними батьківськими штамми (Tsygulnyk et al., 2020).

Неконвенційні дріжджі *Yarrowia lipolytica* також були залучені до розробки надсинтетиків рибофлавіну (Wagner et al., 2018). Випадковим чином, дослідниками було виявлено, що видалення гена біосинтезу лейцину (генотип *leu2*) призводить до того, що клітини дріжджів набувають злегка жовтої пігментації і, як з'ясовано, синтезують вищі рівні рибофлавіну, порівняно із батьківським штамом (Blazeck et al., 2014). Ще більшого синтезу рибофлавіну вдалося досягти при видаленні гена фактора біогенезу пероксисом *PEX10* (генотип *leu2 pex10*) що, як відомо, впливає на накопичення ліпідів (Blazeck et al., 2014; Mauersberger et al., 2001; Xue et al., 2013). Ген *RIB1*, що кодує перший етап біосинтезу рибофлавіну було надекспресовано під контролем сильного гібридного промотору 16dTEF (Blazeck et al., 2011; Blazeck et al., 2012). Ця надекспресія призвела до збільшення загальної продукції рибофлавіну в 11 разів порівняно з батьківським штамом *leu2 pex10*, а саме, 7,0 мг/л. На додаток, надекспресія другого ферменту флавіногенезу призвела до статистично значущого збільшення загального синтезу рибофлавіну, сягнувши 11 мг/л у культурі в пробірці. Більше того, спільна надекспресія *RIB1* і *RIB3* в одному штамі призвела до значного зсуву в локалізації продукowanego рибофлавіну. Частка позаклітинного рибофлавіну збільшилася з 45% до 81%. Цей штам з високою продуктивністю та переважно позаклітинною локалізацією рибофлавіну згодом був обраний в якості основи для подальших еволюційних інженерних зусиль у цьому напрямку (Wagner et al., 2018).

1.5. Підсумок

У огляді літератури розкрито шляхи біосинтезу рибофлавіну та флавінових коферментів у еубактерій, архей, рослин, цвілевих грибів та дріжджів. Розглянуто основну відмінність між синтезом рибофлавіну у бактерій, рослин та, з іншого боку – у дріжджів та цвілевих грибів. Вона полягає у зміні порядку реакцій дезамінування та відновлення рибози. Розкрито чинники регуляції флавіногенезу у бактерій, флавіногенних грибів та дріжджів.

Розглянуто важливість функціонування ПФШ у живих клітинах, а також роль цього метаболічного шляху у постачанні одного із двох попередників вітаміну B₂, а саме Ру5Ф.

Також розкрито основні напрямки та досягнення в метаболічній інженерії та селекції поліпшених продуцентів рибофлавіну на основі флавіногенних та нефлавіногенних дріжджів. Зосереджено увагу на регуляції експресії структурних генів, що залучені безпосередньо у синтез флавінів або генів, що залучені у інші шляхи, які забезпечують клітину попередниками для утворення рибофлавіну. Наприклад, надекспресія генів залучених у пуриновий синтез.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

Для проведення досліджень було використано хімічні сполуки, реактиви та ферменти виробництва фірм «Sigma» (США), «NEB» (США), «Promega» (США), «Roth» (Німеччина), «Difco» (США), «Reanal» (Угорщина), «Fermentas» (Литва). Також використано хімічні реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «хч» та «осч».

2.2. Штами мікроорганізмів

Штами дріжджів *C. famata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. stipitis*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii* та бактерій *E. coli*, використані у роботі, представлені у ДОДАТКУ 2.

2.3. Плазмід

Плазмід, використані у цій роботі представлено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Перелік плазмід, використаних у дисертаційній роботі

Назва плазмід	Посилання на конструювання
1	2
pTb	(Dmytruk et al., 2006)
pVMA1Δ_ble	Розділ 3.1
p19L2	(Voronovsky et al., 2002)
pSEF1Δ_LEU2	Розділ 3.2.1
pG-SAT-1	(Millerioux et al., 2011)

1	2
pUC57	(Fermentas, Вільнюс, Литва)
pNTC/SEF1pr_Cf	Розділ 3.2.1
pNTC/SEF1pr_Ca	Розділ 3.2.1
pNTC/SEF1pr_Ct	Розділ 3.2.1
pNTC/SEF1pr_Ss	Розділ 3.2.1
pNTC/SEF1pr_Sc	Розділ 3.2.1
pNTC/SEF1pr_Cf/ORF_Ps	Розділ 3.2.2
pUC57_prTEF1Cf_trTEF1Dh_Ble_Sa	(Цирульник А. О., Інститут біології клітини НАН України)
pUC57_prTEF1Cf_ZWF1Cf_trTEF1Dh_Ble_Sa	Розділ 3.3.1
pUC57_prTEF1Cf_GND1Cf_trTEF1Dh_Ble_Sa	Розділ 3.3.1
pUC57_prTEF1Cf_ZWF1Cf_trTEF1Dh_prTEF1Cf_GND1Cf_trTEF1Dh_Ble_Sa	Розділ 3.3.1
pUC57_prTEF1Cf_SOL3Cf_trTEF1Dh_Ble_Sa	Розділ 3.3.3
pGFP	(Barelle et al., 2004)
pRFE1	(Tsyrlunyk et al, 2020)
pRFE1-G	Пункт 3.4

2.4. Праймери

Праймери, використані у цій роботі представлено у ДОДАТКУ 3.

2.5. Поживні середовища, умови культивування мікроорганізмів

Штами дріжджів *C. famata* культивували при 28 °C та швидкості обертання – 200 об/хв, на багатому середовищі YPD (1% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 2% глюкоза (Ausubel et al., 2003) та на стандартному мінімальному середовищі YNB (0,67% Yeast Nitrogen Base, 2% глюкоза); на YNB з 5% глюкози та на

молочній сироватці, що містить 5% лактози та 0,3 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для вирощування ауксотрофних штамів у YNB додавали відповідний фактор росту – лейцин, в концентрації 40 мг/л. Для створення умов дефіциту заліза в середовище додавали Ферозин концентрацією 1мМ. Селекцію трансформантів *S. famata* проводили на середовищі з флеоміцином (20 – 30 мг/л) та норзеотрицином (4 – 20 мг/л). Для порівняння Середовища стерилізували автоклавуванням. Водні розчини лабільних сполук стерилізували фільтруванням через нітроцелюлозні фільтри (розмір пор 0,2 мкм) і додавали до середовищ перед використанням. Агаризовані середовища і для бактерійних, і для дріжджових штамів містили 1,5% агару. Бактерії *Escherichia coli* DH5 α вирощували при 37°C на багатому (LB) середовищі (Ausubel et al., 2003). Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

2.6. Біохімічні методи

2.6.1. Отримання безклітинних екстрактів

Для приготування безклітинних екстрактів використовували скляні кульки. Клітини дріжджів осаджували центрифугуванням впродовж 10 хвилин при +4°C. і відмивали від культуральної рідини дистильованою водою і двічі 50 мМ Tris-HCl буфером, рН 7,5 що містив 1 мМ PMSF (фенілметансульфонілфлуорид), 2 мМ MgCl_2 та 1 мМ DTT (дитіотрейтол) та відмивали ще двічі. Клітини суспендували в цьому ж буфері до кінцевої концентрації клітин 50 – 100 мг/мл. Одержану суспензію переносили у пластикові пробірки «Еппендорф» та додавали скляні кульки (діаметр 0,45 – 0,5 мм) в кількості 3/4 від об'єму суспензії і заморожували. Клітини руйнували методом вортексування (вібрації) протягом 2 хв. при +4°C. Після кожного струшування суспензію охолоджували на льоді впродовж двох хвилин. Руйнування повторювал шість разів. Для отримання безклітинного екстракту гомогенізатор центрифугували впродовж 20 хв при 14000 об./хв при +4°C на мікроцентрифузі. Супернатант використовували для подальшого аналізу.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі та співавторами (Lowry et al., 1951).

2.6.2. Визначення активності ферментів

Для визначення активності ферментів Г6ФДГ та 6ФГДГ використовували реакційну суміш, що містила 50 мМ TrisHCl буфер, pH 8,1, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ НАДФ⁺, 100 мкл безклітинного екстракту – 0,005 – 0,04 мг білка/мл. Реакцію запускали додаванням 100 мкл 2мМ розчину субстрату (глюкозо-6-фосфату або 6-фосфоглюконату) до 1 мл реакційної суміші. Інкубували упродовж 5 хв за кімнатної температури. Визначали зміну екстинкції при довжині хвилі 340 нм в кінетиці (Bergmeyer and Gawehn, 1974). Активність ферментів розраховували у U/мл за формулою 2.1, де U/ml – кількість мкмоль субстрату в мл, перетворення яких каталізує одиниця ферменту за хвилину; ($A_{340\text{nm}}/\text{min test} - A_{340\text{nm}}/\text{min blank}$) – різниця екстинкції між досліджуваним зразком та нульовою пробєю; V – об'єм реакційної суміші; df – коефіцієнт розведення; 6,22 – мілімолярний коефіцієнт екстинкції β-НАДФН при 340 нм; 0,1 – об'єм використаного фермента (білка) у мл. Питома активність одиниці активності визначалася як активність фермента в U/мл розділена на концентрацію білка в досліджуваному зразку в мг/мл.

Формула 2.1

$$U/ml \text{ фермента} = \frac{(A_{340\text{nm}}/\text{min test} - A_{340\text{nm}}/\text{min blank})(V)(df)}{(6.22)(0.1)}$$

2.7. Визначення біомаси

Біомасу дріжджів визначали спектрофотометрично за допомогою спектрофотометра Helios g ($\lambda = 546$ нм, кювета 1 см). Суху вагу розраховували за калібрувальною кривою.

2.8. Визначення концентрації рибофлавіну

Концентрацію рибофлавіну в зразках визначали за допомогою флуориметра Turner Quantech Digital Filter Fluorometer FM109510-33, використовуючи фільтри збудження NB440 та емісії SC535 згідно з інструкціями виробника. Як зразки використовували відібрану культуральну рідину. Перед вимірюваннями у зразках видаляли біомасу та здійснювали розведення у 10 – 2000 разів, залежно від очікуваної концентрації рибофлавіну. Для порівняння використовували стандартний розчин вітаміну B₂ з концентрацією 400 нг/мл.

2.9. Основні молекулярно-генетичні методи

2.9.1. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів

Даний метод є модифікацією методу, розробленого для *S. cerevisiae* (Johnston, 1994) з використанням літикази для сферопластування клітин, рибонуклеази А (РНКази А) для розщеплення РНК та осадження ДНК спиртом. Цей метод використовується для виділення плазмідної ДНК з клітин дріжджів. Метод було оптимізовано при виконанні даної роботи.

Клітини вирощували в 3 мл рідкого селективного середовища при 37 °C до пізньої логарифмічної фази (OD₆₀₀ 4 – 6; кювета 1 см). Біомасу осаджували центрифугуванням і ресуспендували у 0,3 мл 50 мМ розчину етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) (рН 8,0). До ресуспендованих клітин додавали літиказу та інкубували 60 хв при 37 °C. Клітини осаджували центрифугуванням при 12000 об/хв протягом 2 хв, супернатант зливали, а до осаду додавали 0,3 мл лізуючого розчину (0,2% додецилсульфат натрію (SDS), 50 мМ (ЕДТА). Після ресуспендування осаду мікропробірки прогрівали при 65 °C упродовж 15 – 30 хв. Мікропробірки охолоджували до кімнатної температури, до інкубаційної суміші додавали 0,1 мл 3М ацетату калію рН 5,2; енергійно перемішували та витримували на льоді 5 хв, потім центрифугували при 12000 об/хв протягом 3 хв. Супернатант переносили до чистих мікропробірок, що містили по 0,3 мл ізопропанолу. Проби витримували

протягом 10 хв, після чого центрифугували при 12000 об/хв протягом 3 хв, супернатант зливали, а осад промивали 70% етанолом та підсушували. Одержану ДНК розчиняли в 100 мкл ТЕ буферу (10 мМ Tris HCl, pH 8,0; 1 мМ ЕДТА pH 8), додавали 5 мкл розчину РНКаз А (10 мг/мл), перемішували та інкубували 20 хв при 37 °С. До інкубаційної суміші додавали 100 мкл фенолу. Центрифугували при 14000 об/хв 15 хв, водну фазу переносили у свіжу центрифужну мікропробірку, додавали 0,1 об'єму 3М ацетату калію pH 5,2 та 2 об'єми 96% етанолу. Витримували при -20 °С 15 хв, центрифугували при 14000 об/хв 15 хв, одержаний осад промивали 70% етанолом та підсушували. Одержану ДНК розчиняли в 30 мкл ТЕ-буферу, зберігали при -20 °С.

2.9.2. Виділення плазмідної ДНК з клітин *E. coli*

Клітини трансформантів *E. coli* вирощували у середовищі LB з ампіциліном концентрації 100 мг/л (об'єм 1,5 мл) упродовж 14 – 16 год. та осаджували центрифугуванням (10 тис. об./хв, 3 хв) у пластикових пробірках двічі для повного видалення залишків поживного середовища. Осад клітин ресуспендували в 0,15 мл ТЕ-буферу (pH 7,5) перемішуванням та додавали 0,15 мл 0,2 М розчину NaOH і 1% SDS, інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хв. Після цього додавали 0,15 мл 2М розчину ацетату калію; акуратно перемішували та інкубували на льоді протягом 15 хв. Осад білків усували центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 20 хв (при кімнатній температурі) та відбирали супернатант (0,4 мл) у чисті пробірки. До супернатанту додавали 0,7 об'єму (0,3 мл) ізопропанолу, перемішували та центрифугували при 10 тис. об./хв протягом 20 хв при кімнатній температурі. Осад ДНК та РНК промивали 70% етанолом та після підсушування ресуспендували у 40 мкл стерильної дистильованої води або ТЕ буферу. Розчин ДНК зберігали при -20 °С.

Для виділення плазмідної ДНК у препаративних кількостях використовували набір реагентів (midi-kit) Wizards Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA), згідно методики виробника.

2.9.3. Конструювання плазмід

Метод розщеплення ДНК рестриктазами базується на здатності ендонуклеаз рестрикції класу II розщеплювати ДНК в певних специфічних сайтах. В даній роботі користувалися методикою описаною раніше (Sambrook J, 1989), та інструкціями виробників ферментів: «Fermentas» (Литва), «NEB» (США), «Promega» (США).

Для затуплення «липких» (комплементарних) кінців лінеаризованої ДНК векторів (з метою наступного лігування фрагментів ДНК з “тупими” кінцями) використовували Т4 ДНК-полімеразу.

Лігування лінеаризованих фрагментів ДНК здійснювали за допомогою Т4 ДНК-лігази. Для виділення рекомбінантних плазмід суміш після лігування трансформували у клітини *E. coli* методом електропорації (Sambrook J, 1989).

2.9.4. Базові молекулярно-генетичні методи

Виділення та очистку плазмідної ДНК, підготовку та трансформацію компетентних клітин *E. coli*, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюцію фрагментів ДНК з агарозного гелю, розщеплення ДНК рестриктазами, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК, ампліфікацію фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) здійснювали як описано у (Sambrook J, 1989). Очистку ДНК проводили на колонках фірми «Quiagen» (США) (Quiagen PCR purification Kit). Для ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР використовували синтетичні олігонуклеотидні праймери фірм «IDT Technologies» або «Sigma» (США). ПЛР-ампліфікацію фрагментів здійснено використовуючи Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) відповідно до рекомендацій виробника. ПЛР проводили з використанням термоциклеру GeneAmps PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.9.5. Трансформація клітин дріжджів

Трансформацію клітин *S. famata* проводили методом електропорації як описано раніше (Voronovsky et al., 2002).

2.9.10. ПЛР у реальному часі

Сумарну РНК з клітин дріжджів виділяли з використанням набору GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit with DNase I (EURx Ltd., Польща). Усі маніпуляції з РНК проводили при охолодженні. Клітини дріжджів осаджували при 4000 об./хв протягом 5 хв, ресуспендували в 1 мл Трізолу. До отриманої суспензії додавали 0,2 мл скляних кульок (діаметр 0,45 мм) і руйнували клітини шляхом струшування на вортексі «FastPrep» при 6000 об./сек протягом 20 сек. Гомогенну суміш центрифугували при 14000 об./хв протягом 15 хв. Супернатант переносили у чисті пробірки типу «Еппендорф», додавали 0,2 мл хлороформу, інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв та центрифугували при 14000 об./хв протягом 15 хв. З відібраної водної фази шляхом преципітації 0,5 мл ізопропанолу отримували нерозчинну фракцію сумарної РНК, яку осаджували при 14000 об./хв протягом 15 хв. Осад промивали 70% охолодженим етанолом, підсушували і розчиняли у воді обробленій діетилпірокарбонатом (DEPC). Отримані проби слугували матрицями для синтезу одноланцюгової кДНК. Концентрацію РНК визначали за допомогою Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer та розчиняли у воді, позбавленій РНКазної активності. ПЛР у реальному часі проводили за допомогою Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System з використанням набору SG OneStep qRT-PCR kit (EURx Ltd., Польща), РНК як матриці та ROX як барвника для нормалізації інтенсивності свічення інтеркалюючих барвників типу Syber Green згідно інструкцій виробника. 100 нг РНК було використано в 20 мкл реакційної суміші, що містить 0,4 мкМ відповідних праймерів (Додаток 3). Використовували наступні параметри ампліфікації: 30 хв при 50 °C для синтезу кДНК; 3 хв при 95 °C підготовка, 40 циклів 15 с при 94 °C та 30 с при 60 °C. Кратну зміну амплікона в дослідному

зразку у порівнянні з контрольним зразком визначали в трьох повторях та описували як RQ – Relative quantification (відносна кількісна оцінка).

2.10. Програмне забезпечення для пошуку та аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей

У роботі використовувалися бази даних *D. hansenii* – (BLAST - *Debaryomyces hansenii* CBS 767, n.d.); Sacerdot et al., 2008; Dujon et al., 2004) та *S. cerevisiae* – (*S. cerevisiae* NCBI-BLAST Search, n.d.). Аналіз нуклеотидної послідовності ДНК проводили за допомогою програм: NEBcutter V2.0 (NEBcutter V2.0, n.d.; Vincze, 2003); Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator, 2007) та пакету програм доступних на (DNA Manipulation, n.d.). Для порівняльного аналізу амінокислотних та нуклеотидних послідовностей використовували програми доступні на (Multiple Sequence Alignment, n.d.). Для аналізу амінокислотних послідовностей використовували алгоритм Multalin версії 5.4.1, (Multiple Sequence Alignment by Florence Corpet, 2000). Пошук подібності амінокислотних послідовностей проводили, використовуючи мережевий сервіс BLAST Національного центру біотехнологічної інформації (Bethesda, MD, USA), (Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

2.11. Статистичний аналіз експериментальних даних

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи стандартні методи. Усі досліди повторювали тричі з трьома паралельними експериментами у кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках та точка ординати діаграм відповідає середньому значенню «М», розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з декількох однотипних експериментів. Середню похибку «m» отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки «б». На рисунках вона представлена біля кожної точки вертикальною лінією, довжина якої відповідає величині «m».

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження впливу делеції гена *IMA1* на синтез рибофлавіну дріжджами *S. famata*.

Флавіногенні дріжджі *S. famata* належать до найактивніших продуцентів рибофлавіну, оскільки спеціально селекціоновані мутанти накопичують близько 21 г/л вітаміну B₂ (Abbas and Sibirny, 2011; Stahmann et al., 2000). Проте промислове виробництво рибофлавіну з використанням мутантних штамів *S. famata* було припинено кілька років тому, в основному, через низьку генетичну стабільність промислових продуцентів (Abbas and Sibirny, 2011). Тим не менш, дріжджі мають ряд технологічних переваг порівняно з цвілевими грибами або бактеріями. Їх набагато легше вирощувати і підтримувати в культурі; розділення та очищення рибофлавіну є менш технологічно складним.

Упродовж останнього десятиліття були розроблені методи трансформації (Voronovsky et al., 2002) та інсерційного мутагенезу *S. famata* (Dmytruk et al., 2006), а також клоновані структурні та регуляторні гени шляху біосинтезу рибофлавіну з у цих дріжджів (Dmytruk et al., 2004, Voronovsky et al., 2004, Dmytruk et al., 2006). За допомогою комбінації методів класичної селекції було сконструйовано сильний продуцент, AF-4 (Dmytruk et al., 2011). Подальше застосування методів метаболічної інженерії дало можливість сконструювати стабільний надпродуцент рибофлавіну, позначеного як #91 або BRP (Dmytruk et al., 2014). Однак він все ще поступається наявним промисловим продуцентам *B. subtilis* і *A. gossypii*. Подальше вдосконалення наявного стабільного продуцента рибофлавіну *S. famata* значною мірою залежить від розуміння регуляції біосинтезу цієї сполуки. На жаль, поки що регуляторні механізми синтезу вітаміну B₂ в дріжджах і ниткоподібних грибах недостатньо вивчені.

Відомо, що пошкодження гена *IMA1*, що кодує вакуолярну АТФазу, спричиняє надсинтез рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Meyerozyma*

guilliermondi (*P. guilliermondii*) (Boretsky et al., 2011). Але його безпосередня роль у синтезі рибофлавіну невідома (Abbas and Sibirny, 2011). Також, схожий ефект проявляється у грибів *A. gossypii*, що супроводжувалося посиленням вивільненням вітаміну із вакуоль у цитозоль та, надалі, у культуральне середовище (Forster et al., 1999). Проте для *P. guilliermondii* досліджено, що ця мутація удвічі підвищує активність ГТФ-циклогідролази II, ключового ферменту рибофлавінового шляху, який забезпечує перетворення ГТФ у ДАРПФ (Boretsky et al., 2011). Фенотип сконструйованих нокаутних штамів *Δvma1* показав, що вони подібно до відповідних інсерційних мутантів *S. cerevisiae* чутливі до підвищеної температури (Kabani et al., 2002). Тобто ріст штамів із делецією гена значно інгібується вже при 37°C, на відміну від клітин дикого типу *P. guilliermondii*. Більше того, також виявили, що вміст заліза у клітинах таких мутантів значно знизився (Boretsky et al., 2011).

Такі дані наштовхнули нас на припущення, що введення відповідних мутацій у дріжджі *C. famata*, які можуть бути придатні до подальшого використання у промисловості, також приведе до позитивного впливу на синтез рибофлавіну.

Для конструювання касети для делеції гена *VMA1* 5' частину гена *VMA1* ампліфікували за допомогою ПЛР з геномної ДНК *C. famata* VKMY-9 за допомогою пари праймерів OL35/OL36, а 3' частина – ампліфікована за допомогою OL37/OL38. Ці два фрагменти були злиті за допомогою ПЛР з перекриттям. Отриманий фрагмент клонували в сайти SacI і SalI вектора pBluescript II KS (-). З плазміді pTb (Dmytruk et al., 2006) було вирізано селективний маркер стійкості до антибіотика флеоміцину, а саме ген *ble* (із *Staphylococcus aureus*) під контролем промотора *TEF1*. Це здійснювали за допомогою пари ендонуклеаз рестрикції EcoRI/KpnI. Кінці фрагмента затупляли ДНК-полімеразою T4 і, далі, клонували в NdeI-лінеаризовану плазміді із затупленими кінцями, щоб отримати кінцевий конструкт pVMA1Δ_{ble}, довжиною близько 5,7 т.п.н. (тисяч пар нуклеотидів) (Рис. 3.1).

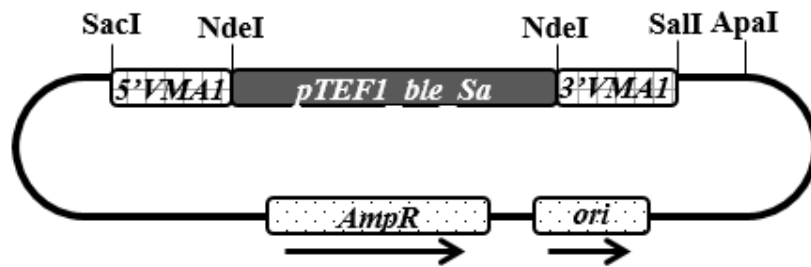


Рис. 3.1. Схема плазмиди pVMA1 Δ _ble: pTEF1_ble_Sa – фрагмент, що забезпечує стійкість до флеоміцину під контролем TEF1 промотора з *C. famata*; 5' та 3'VMA1 – відповідні плечі гена VMA1; ori – точка початку реплікації; AmpR – ген стійкості до ампіциліну; SacI, NdeI, SalI, ApaI – сайти гідролізу ендонуклеаз рестрикції.

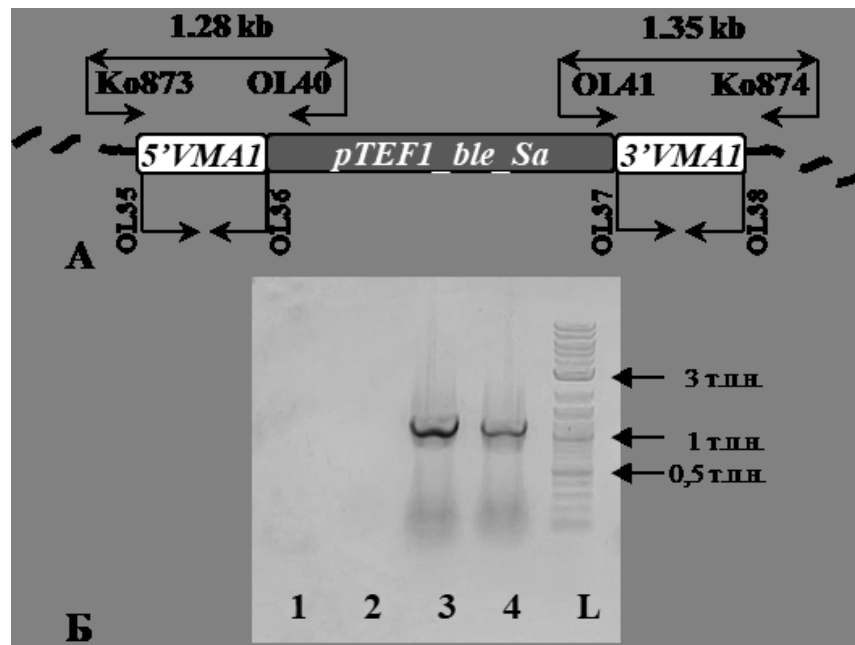


Рис. 3.2. А. Схема інтеграції делеційної касети у геном *C. famata* з праймерами для ПЛР-верифікації та праймерами для клонування частин гена VMA1; Б. ПЛР-продукти зчитані з геномної ДНК штаму L20105 (1,2) та *vma1* Δ (3,4) за допомогою пар праймерів Ko873/OL40 (1 та 3) і OL41/Ko874 (2 та 4) підтверджують коректність інтеграції касети. L – т.п.н. маркер розміру фрагментів ДНК.

Щоб отримати мутанти з делецією гена VMA1, плазмиду pVMA1 Δ _ble лінеаризували за допомогою ендонуклеази AhdI та використали для

трансформації дріжджів *C. famata* штаму L20105. Трансформанти підросували на багатому середовищі YPD із додаванням антибіотика флеоміцину для селекції. Серед 46 отриманих трансформантів лише один містив мутацію гена *IMA1*. Належне підтвердження внесеної мутації виконували за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів OL41/Ко874. Ці праймери були специфічними для визначення 5' фрагмента делеційної касети; та праймери OL40/Ко873 – для виявлення 3' фрагмента (Рис. 3.2, А, Б).

Накопичення біомаси штамом *vma1Δ* зменшилося в 2,8 рази порівняно з батьківським штамом L20105 (Рис. 3.3, Б і Табл. 3.1). Крім того, мутант *vma1Δ* показав збільшення накопичення рибофлавіну, що становить 19,5 мг/л. Це 9,4-кратне підвищення, порівняно з батьківським штамом (Рис. 3.3, А і Табл. 3.1). У зв'язку зі зменшеним накопиченням біомаси, *vma1Δ* виявив 27-кратне збільшення продуктивності синтезу рибофлавіну (розраховано як мг рибофлавіну на г CDW (cell dry weight (ваги сухих клітин)), від такої у батьківського штаму (Табл. 3.1). Накопичення рибофлавіну та ріст клітин делетанта було порівняно також із характеристиками *C. famata* дикого типу VKMY-9. Підтвердилися дані, що у цього штаму рівень синтезу рибофлавіну також нижчий, ніж у *vma1Δ* мутанта. Для проведення аналізу, штами культивували упродовж п'яти днів на YNB з глюкозою та із додаванням лейцину.

Таблиця 3.1.

Біомаса клітин, синтез рибофлавіну та вихід рибофлавіну у штама *C. famata vma1Δ* та штаму L20105 на п'ятий день культивування

Штам	Біомаса (г/л)	Рибофлавін (мг/л)	Вихід рибофлавіну (мг/г)
<i>vma1Δ</i>	1,22 ± 0,06	20,50 ± 1,05	16,81 ± 0,84
L20105	3,44 ± 0,17	2,07 ± 0,10	0,60 ± 0,03
VKMY-9	3,64 ± 0,18	18,14 ± 0,90	5,05 ± 0,25

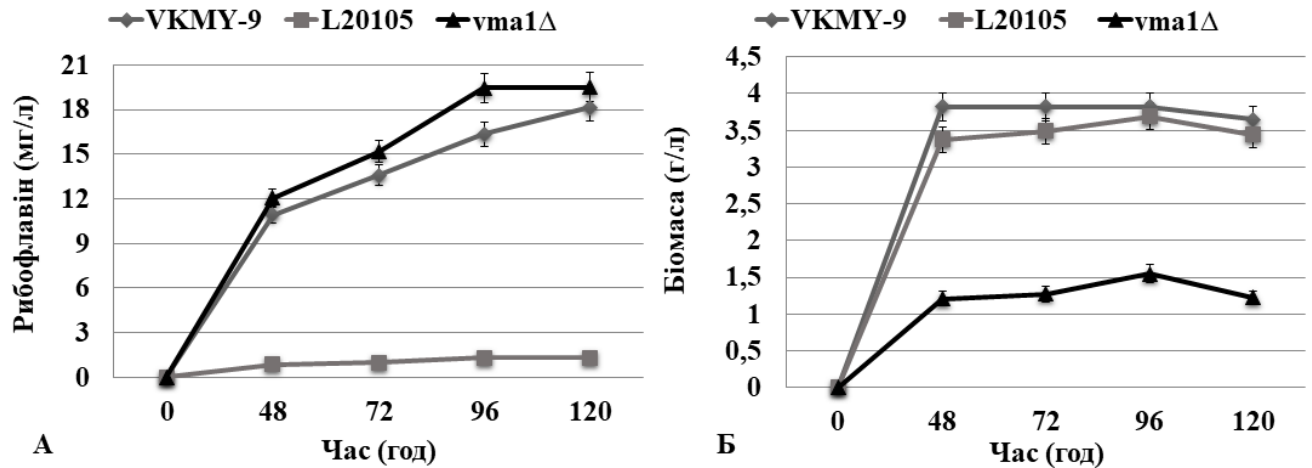


Рис. 3.3. Синтез рибофлавіну (А) та накопичення біомаси (Б) штамами *S. fatata* L20105, VKMY-9 та *vma1Δ* при вирощуванні на YNB з лейцином в колбах.

Отриманий мутант *vma1Δ* показав чутливий до температури фенотип (Рис. 3.4, А, Б). При температурі 35°C ріст клітин був значно слабшим, ніж при 28°C, крім того, біосинтез рибофлавіну також знизився. Ріст вихідного штаму, та його ріст на YNB з лейцином був лише незначно пригнічений. На додаток, *S. fatata* L20105 почав синтезувати підвищену кількість рибофлавіну порівняно із синтезом в умовах культивування при 28°C (Рис. 3.4, А, Б). Ймовірно, це свідчить про те, що для флавіногенних дріжджів, надпродукція рибофлавіну постає захисним фактором у відповідь на стресові умови. Подібні дані та відповідні висновки описано для дріжджів *P. guilliermondii* (Boretsky et al., 2005).

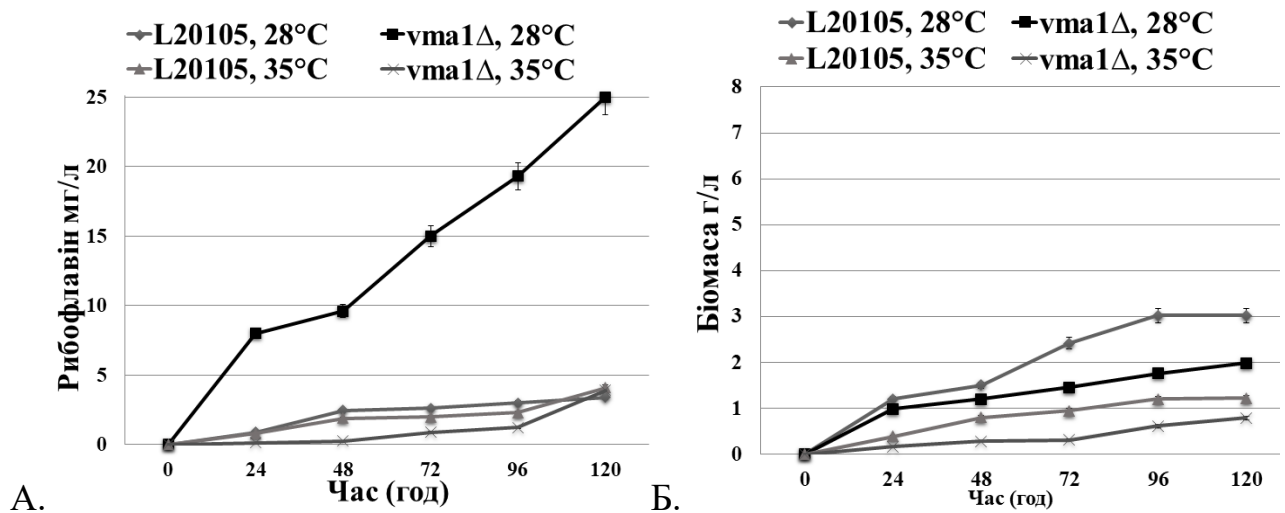


Рис. 3.4. Синтез рибофлавіну (А) та накопичення біомаси (Б) штамами *C. famata* L20105 та *vma1Δ* на YNB з лейцином в колбах при температурі 28°C та 35°C.

Здатність до надмірної продукції рибофлавіну в промислових штамів, ймовірно, не лише пов'язана з мутаціями окремих генів, а також може залежати від генів, які безпосередньо не беруть участь у біосинтезі рибофлавіну. Це чітко продемонстровано раніше шляхом інсерційного мутагенезу гена *MET2* (Dmytruk et al., 2006), а у цій роботі – делецією *VMA1*.

Якщо пошкодження гена *VMA1* у *C. famata* приводить до збільшення виходу рибофлавіну, як і у *P. guilliermondii*, можна припустити, що в клітинах *C. famata vma1Δ* теж зростає активність ГТФ-циклогідролази II (Boretsky et al., 2011). Підвищений синтез рибофлавіну може проявлятися як реакція клітин флавіногенних дріжджів на стрес, пов'язаний з видаленням гена, що кодує вакуолярну АТФ-азу, адже її активність створює і підтримує кисле значення рН всередині органел центральної вакуолярної системи, включаючи лізосоми, ендосоми, апарат Гольджі, секреторні везикули та, зазвичай, забезпечують енергію, необхідну для транспортних процесів у вакуолярній системі еукаріотичних клітин (Mellman et al., 1986; Bowman and Bowman, 1986; Nelson, 1988; Forgacs, 1989; Nelson, 1989). Ми можемо лише здогадуватись про роль *VMA1* у продукції вітаміну, але розуміємо, що видалення цього гена може бути

використане для створення більш ефективних промислових продуцентів (Andreieva et al., 2020b).

Тому важливим завданням було отримати штами із делецією цього гена у існуючих надпродуцентів рибофлавіну, BRP та AF-4. Для цього використовували плазмиду pVMA1 Δ _ble, яку лінеаризували за допомогою ендонуклеази AhdI та вводили в геном дріжджів *C. famata* BRP та AF-4 за допомогою електропорації. У результаті, на селективному середовищі з антибіотиком флеоміцином було отримано 65 трансформантів на основі штама BRP та 260 – на основі AF-4. Далі отримані колонії вирощували на селективному середовищі. Проте при проведенні ПЛР-аналізу, мутантів з делецією гена *VMA1* виявити не вдалось. Дріжджі *C. famata* характеризується низькою частотою гомологічної рекомбінації, тому для отримання штаму з делецією цільового гена потрібно проаналізувати значно більшу кількість трансформантів.

Результати досліджень, що представлені у цьому пункті опубліковані дисертанткою у експериментальній статті: Andreieva, Y., Petrovska, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020). Role of the regulatory genes *SEF1*, *VMA1* and *SFUI* in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*, 37(9–10), 497–504. <https://doi.org/10.1002/yea.3503>.

3.2. Транскрипційний фактор Sef1 та його вплив на процеси флавіногенезу у дріжджів *C. famata*

Флавіногенні дріжджі *C. famata* надпродукують рибофлавін за умов низького постачання клітин залізом. Однак регулювання цього процесу мало вивчено. Транскрипційний фактор Sef1 є одним із позитивних регуляторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів, зокрема у *C. famata* (Dmytruk et al., 2006). Як згадувалося у огляді літератури, штам *C. famata* der8, що раніше використовувався у промисловості для отримання рибофлавіну мав конститутивно дерепресовану експресію гена *SEF1* (Abbas and Sibirny, 2011).

Ген цього фактора також присутній в геномах нефлавіногенних дріжджів, проте там він не бере участі у регуляції синтезу рибофлавіну (Groom et al., 1998). Роль, яку відіграє *Sef1* нефлавіногенних дріжджів ще не повністю з'ясована. Але відомо, що цей фактор може активувати гени збирання Ферум-Сульфурних кластерів у *Candida glabrata*. *Sef1* також відіграє незначну роль в активації експресії генів кількох ферментів циклу трикарбонових кислот (Gupta and Outten, 2020). Гомолог гена *SEF1* *K. lactis*, як згадувалося в огляді літератури, бере участь у дозріванні мітохондріальної тРНК (Groom et al., 1998).

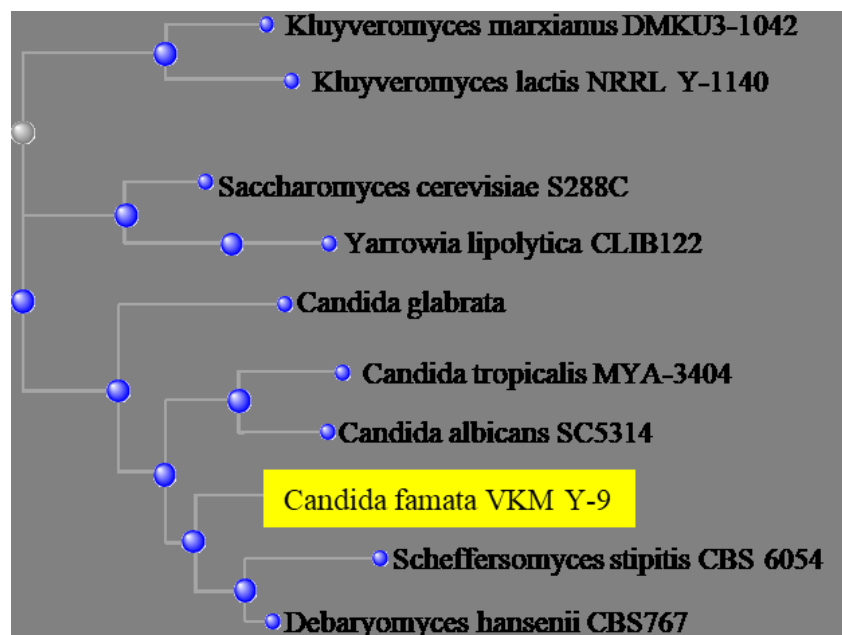


Рис. 3.5. Філогенетичне позиціонування гена *SEF1* *C. famata* та інших видів дріжджів, а саме *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *S. stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *C. glabrata*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii* (побудовано за допомогою програми пошуку локальних вирівнювань «BLAST»).

Аналіз послідовностей гена *SEF1* *C. famata* та пошук локальних вирівнювань у відповідних генах інших флавіногенних та нефлавіногенних організмів допоміг встановити певний рівень гомології між ними. Наприклад, ген *SEF1* *C. albicans* на 72,83% ідентичний гену *SEF1* *C. famata*. *C. tropicalis* – на 73,67%; *S. stipitis* – на 71,92%; *S. cerevisiae* – 67,34%. Раніше вважали, що *C.*

tropicalis є нефлавіногенними дріжджами. Проте аналіз послідовності гена та побудова філогенетичного дерева за геном *SEF1* *C. famata* (Рис. 3.5) та інших дріжджів показав філогенетичну спорідненість між *SEF1* флавіногенних дріжджів та *SEF1* *C. tropicalis*.

3.2.1. Роль промотора гена транскрипційного фактора Sef1 флавіногенних та нефлавіногенних дріжджів у біосинтезі рибофлавіну флавіногенними дріжджами *C. famata*

У цій роботі ген *SEF1* *C. famata* поміщено під контроль промоторів *SEF1* з інших флавіногенних та нефлавіногенних дріжджів, щоб дослідити їх вплив на експресію транскрипційного активатора, а отже, і на біосинтез рибофлавіну.

Для перевірки роботи промоторів із різних дріжджів ген *SEF1* вирішено вилучити з геному *C. famata*. Для цього була створена делеційна касета. Касета була сконструйована на основі плазмиди p19L2 (Voronovsky et al., 2002). Фрагмент ДНК, що містив 5'-частину гена *SEF1* *C. famata*, ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ko478/Ko479. Як матрицю використовували геномну ДНК штаму *C. famata* L20105. Отриманий фрагмент розщеплювали ендонуклеазою рестрикції PstI і клонували в PstI-лінеаризовану плазмиду p19L2. 3'-частину гена *SEF1* ампліфікували за допомогою праймерів Ko480/Ko481 і субклонували в плазмиду p19L2, що містить 5'-частину *SEF1*, використовуючи сайти для ендонуклеаз рестрикції SalI і BamHI. Сконструйована плазміда також містила ген *LEU2*, що відновлював прототрофічність трансформантів і, таким чином, слугував як селективний маркер. Отриману касету було названо pSEF1Δ_LEU2, її розмір складав приблизно 7,6 т.п.н. (Рис. 3.6).

Штам *C. famata* L20105 трансформували делеційною касетою, лінеаризованою ендонуклеазою рестрикції SalI, використовуючи метод електропорації. Трансформанти відбирали на твердому YNB без лейцину. Відібрані штами були перевірені на здатність продукувати рибофлавін в умовах недостатнього забезпечення залізом. Штами вирощували на YNB, що містило 1

мМ 3-(2-піридил)-5,6-дифеніл-1,2,4-триазин-4',4'-дисульфат (ферозин). Ферозин – хелатуючий агент, що здатний зв'язувати іони Феруму. 50 штамів, які не були здатні синтезувати рибофлавін при дефіциті заліза, були відібрані для подальшого аналізу.

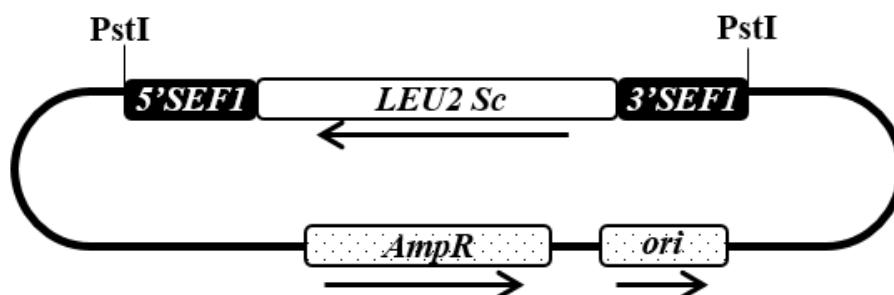


Рис. 3.6. Схема плазміди pSEF1Δ_LEU2: *LEU2Sc* – ген *LEU2* із *S. cerevisiae*; 5' та 3'*SEF1* – відповідні плечі гена *SEF1*; *ori* – точка початку реплікації; *AmpR* – ген стійкості до ампіциліну; PstI – сайти гідролізу ендонуклеазою рестрикції.

Ці штами проаналізували для підтвердження коректності делеції з використанням праймерів, комплементарних ділянкам ДНК за межами ВРЗ *SEF1* (Ko392/Ko394) і послідовності гена *LEU2* (Ko482/Ko483). 5'- та 3'-частини зруйнованого гена перевіряли за допомогою пари праймерів (Ko392/Ko482 або Ko394/Ko483) (Рис. 3.7, А, Б). Лише два штами містили мутацію гена *SEF1*. Штами *sef1Δ* втратили здатність до надсинтезу рибофлавіну подібно до інсерційного штаму *C. famata* із пошкодженням гена *SEF1* (Dmytruk et al., 2006).

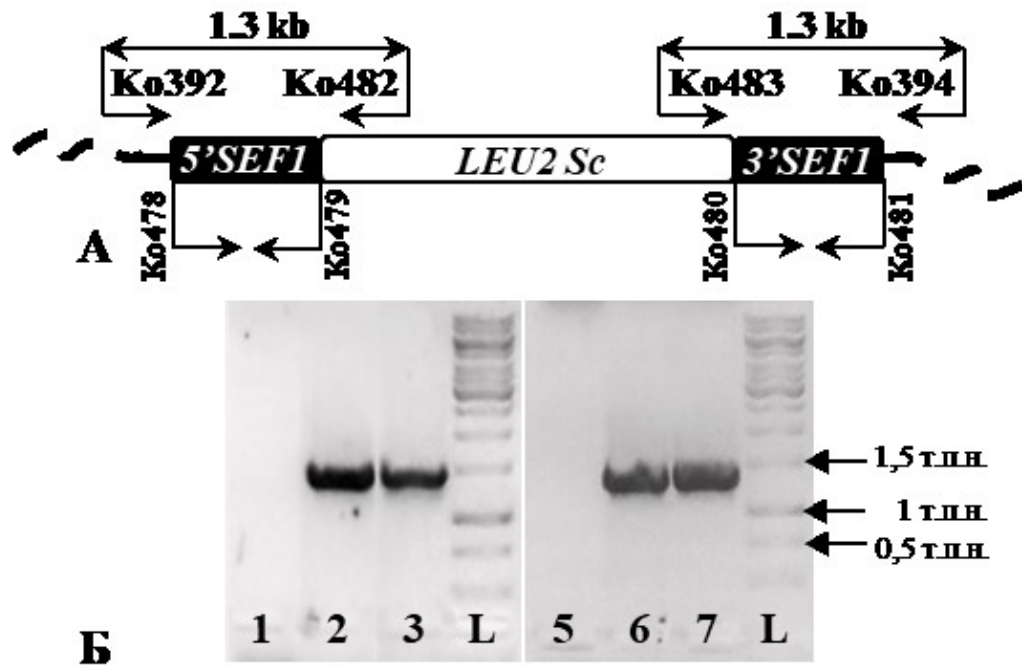


Рис. 3.7. А. Схема інтеграції делеційної касети гена *SEF1* у геном *C. famata* з праймерами для ПЛР-верифікації та праймерами для клонування частин гена *SEF1*; Б. Електрофореграма ПЛР-продуктів з використанням пар праймерів Ko392/Ko482 (1,2,3) та Ko483/Ko394 (5,6,7) з геномною ДНК штамів L20105 (1,5) та *sef1Δ* (2,3,6,7) у якості матриці, що підтверджує коректність делеції гена *SEF1*; L – т.п.н. маркер розміру фрагментів ДНК.

Для дослідження можливої видоспецифічної регуляції транскрипції гена *SEF1* було сконструйовано набір касет експресії гена *SEF1*. З цією метою, з плазмиди pG-SAT-1 (Millerioux et al., 2011) було ампліфіковано ген *SAT1* (*NTC1*), що забезпечує стійкість до норзеотрицину. Для цього використовували праймери OL86/OL87. Далі, утворений фрагмент було гідролізовано ендонуклеазою рестрикції NdeI. Продукт гідролізу клонували в NdeI-лінеаризовану плазмиду pUC57. ВРЗ гена *SEF1* *C. famata* VKMY-9 з нативним термінатором було зчитано з геномної ДНК. У ПЛР використовували пару праймерів OL20/OL143. Ампліфікований фрагмент було гідролізовано ендонуклеазами рестрикції BamHI/SacI та клонували у відповідні сайти плазмиди. Для аналізу промоторів флавіногенних та нефлавіногенних дріжджів

їх ампліфікували з геномної ДНК відповідних дріжджів, а саме з *C. famata*, використовуючи праймери OL144/OL145, *C. albicans* (OL146/OL147), *C. tropicalis* (OL148/OL149), *S. stipitis* (OL152/OL153), *S. cerevisiae* (OL154/OL155). Кожен із промоторів клонували перед *SEF1* геном *C. famata* у сайті рестрикції *ApaI* та *BamHI*. Сконструйовані рекомбінантні плазмиди позначили pNTC/*SEF1pr_Cf*, pNTC/*SEF1pr_Ca*, pNTC/*SEF1pr_Ct*, pNTC/*SEF1pr_Ps* та pNTC/*SEF1pr_Sc* (Рис. 3.8). Розмір отриманих плазмід складав приблизно 8,5 т.п.н.

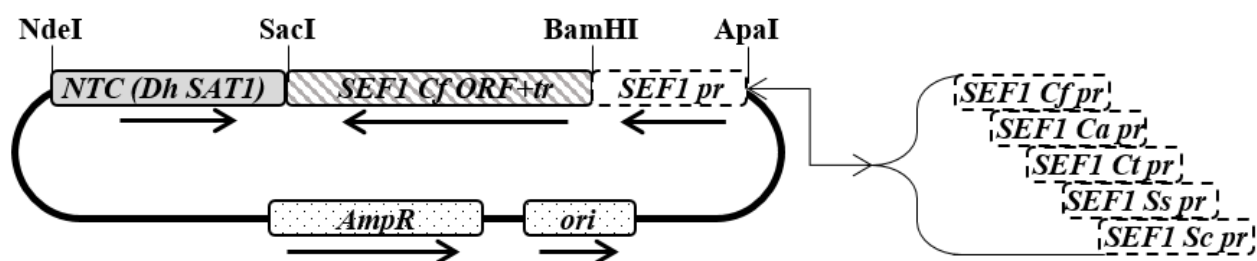


Рис. 3.8. Кільцева схема плазмиди pNTC/*SEF1pr_Cf/Ca/Ct/Ps/Sc*: *NTC (Dh SAT1)* – ген, що забезпечує резистентність до антибіотика норзеотрицину; ВРЗ гена *SEF1 C. famata* під контролем промоторів (*SEF1 pr*) з різних дріжджів позначені довгим посмугованим прямокутником та прямокутниками із пунктирним контуром; *ori* – точка початку реплікації; *AmpR* – ген стійкості до ампіциліну; *NdeI*, *SacI*, *BamHI*, *ApaI* – сайти гідролізу ендонуклеаз рестрикції.

Для аналізу впливу промоторів гена *SEF1* з різних флавіногенних та нефлавіногенних видів дріжджів на експресію *SEF1*, штам *sef1Δ* трансформували плазмидами pNTC/*SEF1pr_Cf*, pNTC/*SEF1pr_Ca*, pNTC/*SEF1pr_Ct*, pNTC/*SEF1pr_Ps*, pNTC/*SEF1pr_Sc*. Селекцію трансформантів проводили на багатому середовищі YPD із додаванням норзеотрицину. Трансформанти стабілізували шляхом культивування в неселективному середовищі з наступним перенесенням на селективне середовище з норзеотрицином.

Підтвердження присутності цільових конструкцій у геномі отриманих трансформантів виконали за допомогою ПЛР з використанням праймерів OL23/OL144 для визначення промотора з *C. famata*, OL23/OL146, OL23/OL148, OL23/OL152, OL23/OL154 для *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. stipitis* і *S. cerevisiae*, відповідно (дані не наведено). По три штами, у яких було підтверджено присутність рекомбінантної плазмиди, використовували для аналізу фенотипу.

Отримані штами культивували упродовж п'яти днів у колбах на YNB з лейцином. Виявлено, що промотори *SEF1* із флавіногенних дріжджів *C. albicans* та нефлавіногенних дріжджів *C. tropicalis*, злиті з ВРЗ гена *SEF1* із *C. famata*, впливають на здатність до відновлення надпродукції рибофлавіну у *sef1Δ*. Показники рівня синтезу рибофлавіну типовими клонами для кожного аналізованого вектора представлені на рисунку та в таблиці (Рис. 3.9, Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Біомаса клітин, синтез рибофлавіну та вихід рибофлавіну у рекомбінантних штамів *C. famata*, вихідного штама *sef1Δ* та штаму дикого типу L20105 на п'ятий день культивування на YNB із додаванням лейцину

Штам	Біомаса (г/л)	Рибофлавін (мг/л)	Продуктивність синтезу рибофлавіну (мг/г)
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_Cf	3,55 ± 0,18	38,97 ± 1,95	10,97 ± 0,61
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_Ca	3,60 ± 0,19	40,34 ± 2,11	11,20 ± 0,71
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_Ct	3,73 ± 0,18	28,03 ± 1,55	7,51 ± 0,39
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_Ss	3,70 ± 0,20	0,62 ± 0,04	0,16 ± 0,01
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_Sc	3,66 ± 0,21	0,81 ± 0,03	0,22 ± 0,01
<i>sef1Δ</i>	2,64 ± 0,15	0,46 ± 0,05	0,17 ± 0,02
L20105	3,44 ± 0,17	2,07 ± 0,07	0,60 ± 0,02

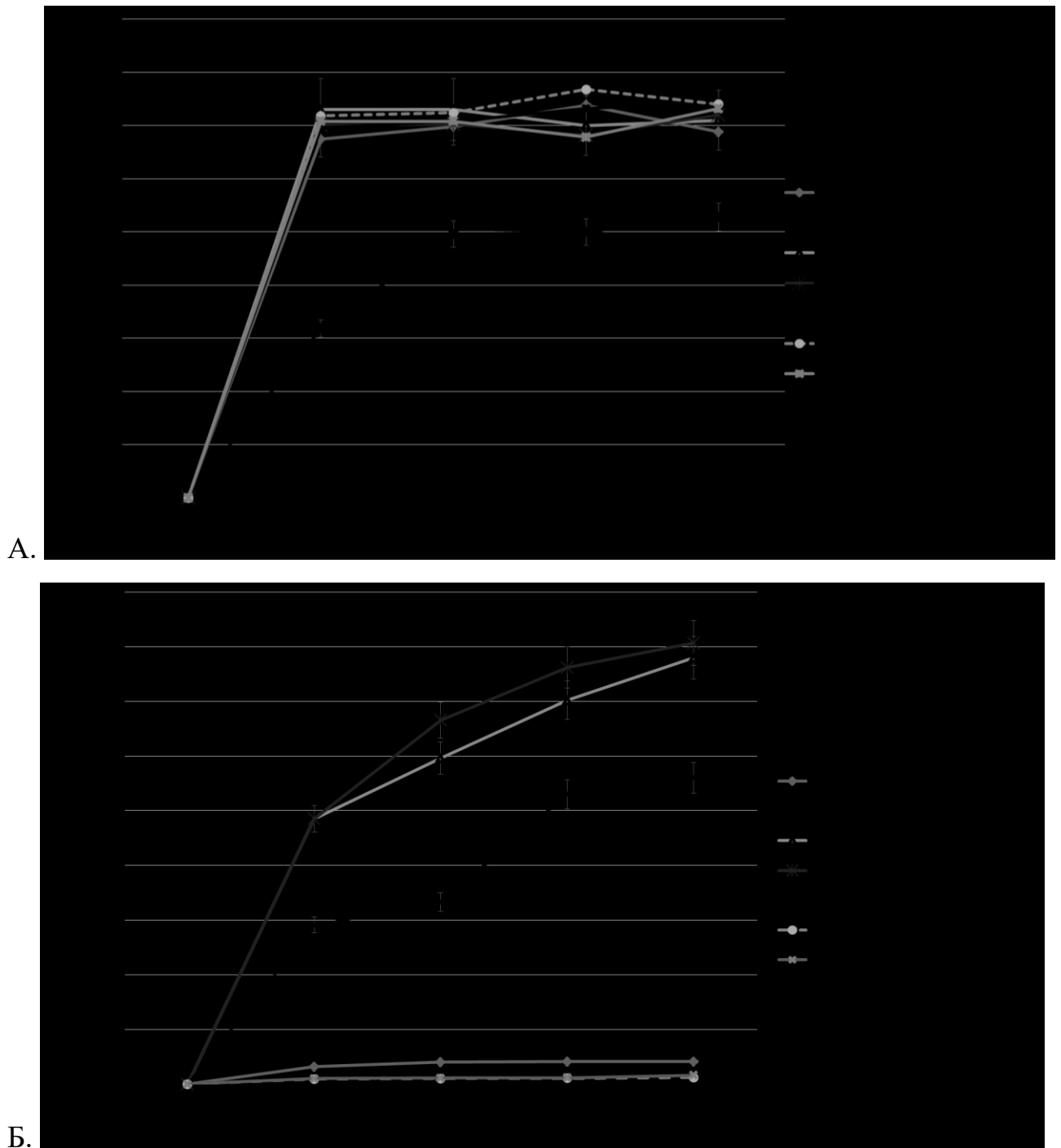


Рис. 3.9. Кінетика накопичення біомаси (А) та синтезу рибофлавіну (Б) рекомбінантними штамами та штамом L20105 на YNB із додаванням лейцину в колбах.

Як видно з рисунку 3.9. Б, синтез рибофлавіну штамами, у яких експресія гена *SEF1* відбувається під контролем промоторів із дріжджів *C. famata*,

C. albicans та *C. tropicalis* зростав, порівняно із штамом L20105 у 18,8; 19,4 та 13,5 разів, відповідно. Щодо накопичення біомаси, то у всіх трансформантів та у штама L20105 значення приблизно однакові. Лише ріст *sef1Δ* у 1,3 рази нижчий, ніж у L20105.

Звичайно, справджуючи наші очікування, штами із промоторами *SEF1* з флавіногенних дріжджів були здатні до надсинтезу рибофлавіну. Однак зростання синтезу флавіну штамом *sef1Δ/pNTC/SEF1pr_Ct* було не очевидним. Є дані про існування флавіногенних і нефлавіногенних штамів в рамках виду *C. tropicalis* (Buzzini and Rossi, 1998; Amornrattanapan, 2013). Ми припускаємо, що *C. tropicalis* займає деяке проміжне положення між флавіногенними та нефлавіногенними видами. Оскільки надсинтез рибофлавіну залежить від багатьох генів та регулюється багатьма чинниками, можна припустити, що у використовуваному штамі *C. tropicalis* деякі гени, природно, запрограмовані на надсинтез вітаміну B₂ (включаючи *SEF1*) (Рис. 3.5), а деякі ні. Таким чином, після введення промотора *SEF1* від *C. tropicalis* в систему високофлавіногенного організму *C. famata* ми отримали «рибофлавіновий фенотип» трансформанта. Проте синтез рибофлавіну в цього трансформанта був нижчим, ніж у випадку використання промотора *SEF1* з іншого флавіногенного організму, наприклад, *C. albicans* (Andreieva et al., 2020a).

Результати досліджень, що представлені у цьому пункті опубліковані дисертанткою у експериментальній статті: Andreieva, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020). *SEF1* and *VMA1* Genes Regulate Riboflavin Biosynthesis in the Flavinogenic Yeast *Candida famata*. *Cytology and Genetics*, 54(5), 379–385. <https://doi.org/10.3103/s0095452720050023>.

3.3. Дослідження ролі генів ферментів окиснювального етапу пентозофосфатного шляху у біосинтезі рибофлавіну

Шлях біосинтезу рибофлавіну починається з двох безпосередніх попередників, гуанозинтрифосфату (ГТФ) і рибулозо-5-фосфату (Ру5Ф) (Abbas

and Sibirny, 2011). Припускаємо, що акумулювання збільшеного пулу цих попередників сприятиме покращенню синтезу рибофлавіну.

Спроби збільшити вихід рибофлавіну за рахунок підвищення рівня синтезу пуринового попередника вже були успішно здійснені. Надекспресія генів *PRS3m* та *ADE4m*, що кодують фосфорибозилпірофосфатсинтетазу та фосфорибозилпірофосфатамідотрансферазу, відповідно, дозволила збільшити продукцію рибофлавіну удвічі (Dmytruk et al., 2020).

Наше завдання полягало в тому, аби збільшити пул іншого попередника рибофлавіну, а саме, рибулозо-5-фосфату. Для цього, ми дослідили, яку роль в надсинтезі рибофлавіну відіграють гени окиснювального етапу ПФШ.

3.3.1. Визначення впливу надекспресії генів *ZWF1* та *GND1* на біосинтез рибофлавіну дріжджами *C. famata*

В окиснювальній гілці ПФШ працюють ферменти Г6ФДГ (ЕС 1.1.1.49, що кодується геном *ZWF1*) і 6ФГДГ (ЕС 1.1.1.44, геном *GND1*). Ці два ферменти залучені у першу та третю НАДФ⁺-залежні дегідрогеназні реакції. Завдяки їм, відбувається перетворення глюкозо-6-фосфату на Ру5Ф (Peuru and Fraenkel, 1968; Wang et al., 2011). Ру5Ф є одним із кінцевих продуктів ПФШ.

Надекспресія та сайт-спрямований мутагенез генів *zwf* та *gnd* із *Corynebacterium glutamicum* у мутантів *B. subtilis* *zwf243* та *gnd361* підвищував концентрацію внутрішньоклітинних метаболітів ПФШ, а також рибофлавіну. Це відбувалося завдяки перенаправленню потоку вуглецю та подальшому збільшенню продукції Ру5Ф (Wang et al., 2011).

У цій роботі два гени *ZWF1* і *GND1*, отримані з використанням геномної ДНК *C. famata* VKM Y-9 як матриці, надекспресували окремо та разом на основі раніше сконструйованих штамів, а саме *C. famata* L20105, AF-4 та AF-4/SEF1/RIB1/RIB7/ARO4 (BRP), відповідно (Voronovsky et al., 2002; Dmytruk et al., 2011; 2014).

Гени *ZWF1* та *GND1* ампліфікували шляхом ПЛР із геномної ДНК штаму дикого типу *C. famata* VKM Y-9 з використанням пар праймерів

Ko1052/Ko1053 та Ko1054/Ko1055 відповідно. Отримані фрагменти *ZWF1* і *GND1* обробляли ендонуклеазами рестрикції *Bam*HI/*Pst*I і *Bam*HI/*Not*I послідовно і клонували у відповідні сайти гідролізу ендонуклеаз рестрикції лінеаризованого вектора pUC57_prTEF1*Cf*_trTEF1*Dh*_Ble_Sa. Цей вектор було сконструйовано у відділі Молекулярної Генетики і Біотехнології (МГіБ), провідним інженером Цирульником А.О., шляхом клонування промотора *TEF1* *C. famata* у вектор pTTb (Tsyurulnyk et al, 2020) замість промотора *TEF1* *D. hansenii*. Для ампліфікації відповідного фрагмента з геному *C. famata* використовували пари праймерів TsFw1 і TsRev1. Цей експресійний вектор містить промотор *TEF1* *C. famata* та термінатор *D. hansenii*, а, крім того, ген *ble*, що забезпечує стійкість до флеоміцину. Вектор створений на основі плазміді pUC57.

Плазміді отримали назви pUC57_prTEF1*Cf*_ZWF1*Cf*_trTEF1*Dh*_Ble_Sa та pUC57_prTEF1*Cf*_GND1*Cf*_trTEF1*Dh*_Ble_Sa, або відповідно, pZWF1 та pGND1 (Рис. 3.10, А та Б).

Щоб створити касету для надекспресії двох генів, ділянку гена *GND1* з промотором та термінатором було ампліфіковано з плазміді pGND1, використовуючи пару праймерів Ko1056/Ko1057 та клоновано в сайт *Kpn*I плазміді pZWF1. Плазміда отримала назву pUC57_prTEF1*Cf*_ZWF1*Cf*_trTEF1*Dh*_prTEF1*Cf*_GND1*Cf*_trTEF1*Dh*_Ble_Sa або pZWF1/GND1 (Рис. 3.10, В).

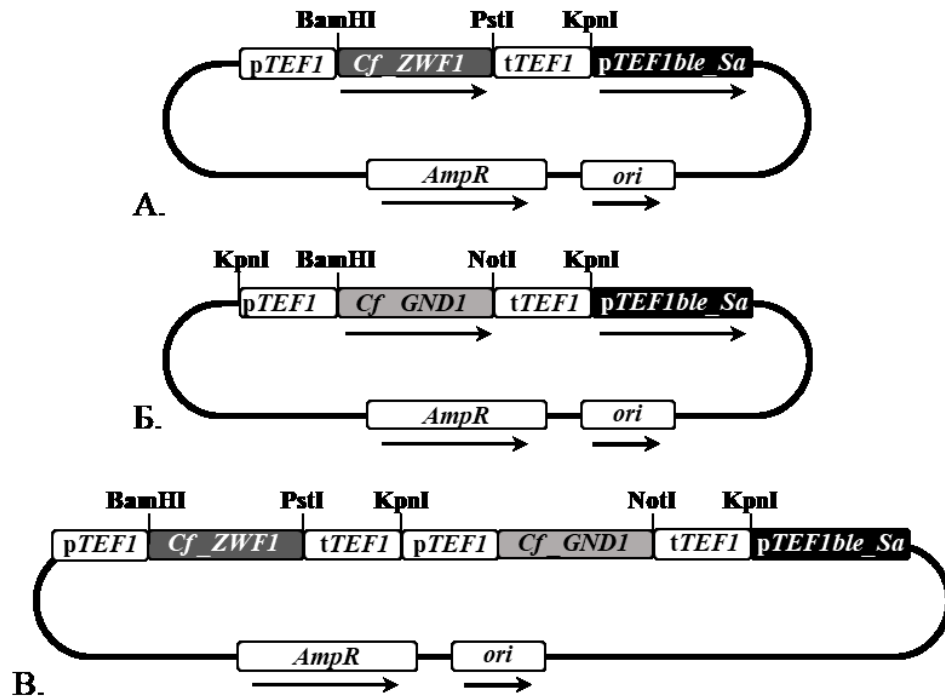


Рис. 3.10. Кільцеві схеми плазмід pZWF1 (А), pGND1 (Б) та pZWF1/GND1 (В): *pTEF1ble_Sa* – ген, що забезпечує резистентність до антибіотика флеоміцину, під контролем промотора *TEF1*; *Cf_ZWF1* – ген Г6ФДГ *C. famata*; *Cf_GND1* – гена 6ФГДГ *C. famata*; *pTEF1* – промотор *TEF1*; *tTEF1* – термінатор *TEF1*; *ori* – точка початку реплікації; *AmpR* – ген стійкості до ампіциліну; Kpn, BamHI, NotI, PstI – сайти гідролізу ендонуклеаз рестрикції.

Всі плазміди було верифіковано гідролізом ендонуклеазами рестрикції та ПЛР аналізом з використанням праймерів Ko1056/ Ko1058 (для pZWF1), Ko1056/ Ko1059 (pGND1), Ko1052/Ko1053 та Ko1054/Ko1055 (для pZWF1/GND1).

Плазміди pZWF1, pGND1 та pZWF1/GND1 лінеаризували по сайту рестрикції AhdI і використовували для трансформації трьох батьківських штамів *C. famata* L20105, AF-4, BRP (Voronovsky et al., 2002; Dmytruk et al., 2011; 2014). Плазміди були випадковим чином інтегровані в геном цих штамів *C. famata*. Трансформанти відбирали після п'яти днів інкубації на багатому середовищі YPD, що містить антибіотик флеоміцин як селективний фактор. Додаткову перевірку трансформантів проводили за допомогою ПЛР,

використовуючи пари праймерів Ko1052/Ko1053 та Ko1054/Ko1055 для штамів з надекспресією *ZWF1* та *GND1*, відповідно. Для перевірки штамів з одночасною надекспресією двох генів *ZWF1/GND1* використовували комбінацію згаданих пар праймерів.

В результаті трансформації, селекції та стабілізації трансформантів отримали штами L20105/*ZWF1*, L20105/*GND1*, L20105/*ZWF1/GND1*, AF-4/*ZWF1*, AF-4/*GND1*, AF-4/*ZWF1/GND1*, BRP/*ZWF1*, BRP/*GND1* та BRP/*ZWF1/GND1*. По три або чотири представники з кожним із вказаних генотипів було підтверджено. У отриманих рекомбінантних штаммах *C. famata* аналізували експресію *ZWF1*, *GND1* або комбінації генів *ZWF1* і *GND1* за допомогою qRT-PCR праймерів YL8/YL9 і YL10/YL11, відповідно. Отримані дані далі порівнювали із рівнем експресії у вихідних штамів. Рівень експресії типових представників наведено у таблиці (Табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Відносні рівні експресії генів *ZWF1* і *GND1* у трансформантів

Штам	RQ гена <i>ZWF1</i>	RQ гена <i>GND1</i>
L20105	1	1
L20105/ <i>ZWF1</i>	5 ± 0,15	—
L20105/ <i>GND1</i>	—	1,58 ± 0,16
L20105/ <i>ZWF1/GND1</i>	1,38 ± 0,04	1,52 ± 0,05
AF-4	1	1
AF-4/ <i>ZWF1</i>	22,6 ± 0,67	—
AF-4/ <i>GND1</i>	—	11,13 ± 0,35
AF-4/ <i>ZWF1/GND1</i>	1,05 ± 0,031	2,02 ± 0,06
BRP	1	1
BRP/ <i>ZWF1</i>	10,6 ± 0,31	—
BRP/ <i>GND1</i>	—	3,74 ± 0,11
BRP/ <i>ZWF1/GND1</i>	1,41 ± 0,04	1,1 ± 0,03

З'ясовано, що експресія поодиноких генів у трансформантів мала щонайменше удвічі вищою ніж у вихідних штамів (Табл. 3.5). Проте, не в усіх штамів, що містили касети для надекспресії двох генів експресія значно переважала експресію у вихідних штамів. А саме, у штама AF-4/ZWF1/GND1 експресія гена *ZWF1* була близькою до показника експресії у вихідного штама AF-4. Крім того, для гена *GND1* рівень експресії був лише у 1,1 рази вищим у штама BRP/ZWF1/GND1.

Експресію генів ПФШ порівнювали із активністю відповідних ферментів. У результаті, міра активності ензимів показала позитивну кореляцію із рівнем експресії генів у трансформантів (Табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Активності ферментів Г6ФДГ та 6ФГДГ у вихідних штамів *C. fumata* та трансформантів

Штам	Активність фермента, U/ml	
	Г6ФДГ	6ФГДГ
L20105	0,32 ± 0,02	0,74 ± 0,04
L20105/ZWF1	6,95 ± 0,34	0,9 ± 0,045
L20105/GND1	0,34 ± 0,016	1,25 ± 0,06
L20105/ZWF1/GND1	5,16 ± 0,25	1,03 ± 0,05
AF-4	2,02 ± 0,1	0,66 ± 0,03
AF-4/ZWF1	17,36 ± 0,86	0,77 ± 0,04
AF-4/GND1	0,34 ± 0,02	2,01 ± 0,1
AF-4/ZWF1/GND1	6,43 ± 0,321	1,93 ± 0,09
BRP	1,33 ± 0,06	0,73 ± 0,03
BRP/ZWF1	15,24 ± 0,76	0,80 ± 0,04
BRP/GND1	0,02 ± 0,01	1,99 ± 0,19
BRP/ZWF1/GND1	1,22 ± 0,06	0,73 ± 0,03

Співвідношення зростання рівня експресії генів та активності відповідних ферментів не рівноцінне. Однією з причин такого явища може бути випадкова інтеграція рекомбінантної плазміди у геном. Проте ми не володіємо знаннями про всі механізми, які можуть впливати на це співвідношення, тому не можемо спекулювати про причини таких відмінностей. Для того, щоб з'ясувати, чи здатні ці рекомбінантні штами надпродукувати рибофлавін, провели дослідження росту та накопичення рибофлавіну у YNB з додаванням 0,05% дріжджового екстракту. *S. famata* L20105 та трансформанти отримані на основі L20105 культивували на YNB із додаванням лейцину, у зв'язку із їхньою ауксотрофністю за цією амінокислотою. Рекомбінантні штами *S. famata* вирощували упродовж п'яти днів. Аналіз накопичення біомаси трансформантами показав, що значними відмінностями у рості штами не володіють. Окрім тих, в яких надекспресовано ген фермента Г6ФДГ, які характеризувалися пригніченим ростом (Рис. 3.11).

Проте синтез флавінів трансформантами набув різного характеру. Штами із надекспресованим геном Г6ФДГ показали значне інгібування синтезу рибофлавіну. У штама BRP/ZWF1, що отриманий на основі найкращого продуцента BRP концентрація флавінів у культуральному середовищі була майже у п'ять разів нижчою, порівняно із вихідним штамом. Ми припускаємо, що це може бути пов'язано із надмірним накопиченням токсичного 6-фосфоглюконолактону в клітині, що створює складні умови для росту та синтезу флавінів (Рис. 3.12).

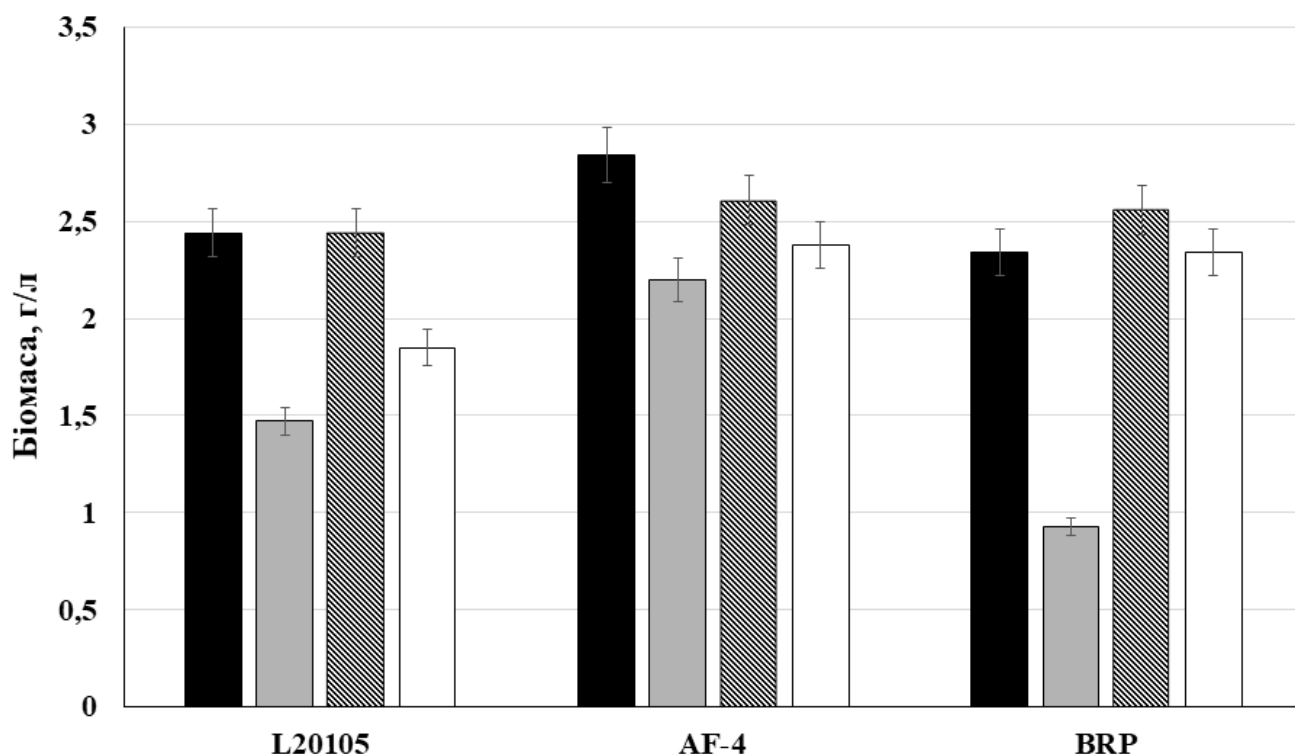


Рис. 3.11. Гістограма накопиченої біомаси клітин у рекомбінантних штамів та вихідних штамів *C. famata* L20105, AF-4 і BRP на п'ятий день культивування: чорні стовпчики – біомаса накопичена батьківськими штамми; сірі стовпчики – біомаса накопичена штамми з надекспресією *ZWF1*; смугасті стовпчики – біомаса накопичена штамми з надекспресією *GND1*; білі стовпчики – біомаса накопичена штамми з посиленою експресією генів *ZWF1* та *GND1*.

Однак, виявлено, що надекспресія гена *GND1* надає здатності до збільшеного утворення рибофлавіну. Для штама L20105/*GND1* цей показник був удвічі більшим, ніж у L20105. Штами AF-4/*GND1* та BRP/*GND1* продукували у 1,5 та 1,3 рази більше рибофлавіну, відповідно, порівняно із вихідними штамми. Трансформанти з ледь посиленою експресією обидвох генів: L20105/*ZWF1*/*GND1*, AF-4/*ZWF1*/*GND1* та BRP/*ZWF1*/*GND1* проявляли лише міnorне збільшення кількості флавінів. Зростання становило не більше ніж у 1,05 рази, порівняно із батьківськими штамми (Рис. 3.11).

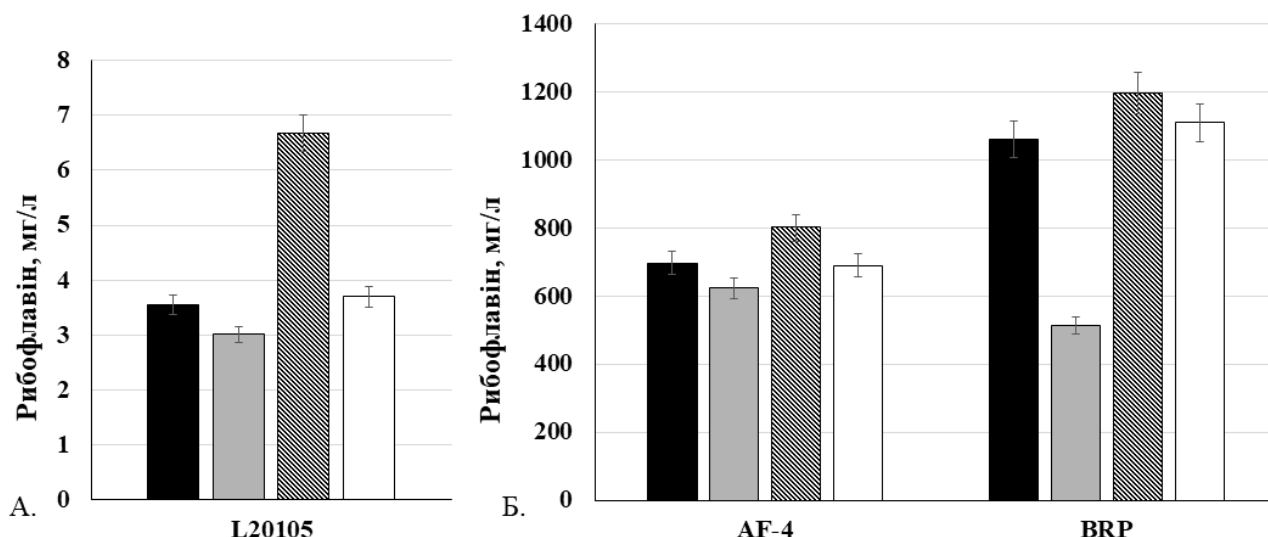


Рис. 3.12. Гістограма продукції рибофлавіну рекомбінантними штамами та вихідними штамами *C. famata* L20105 (А), AF-4 і BRP (Б) на п'ятий день культивування: чорні стовпчики – рівень рибофлавіну синтезованого батьківськими штамами; сірі стовпчики – рівень рибофлавіну синтезованого штамами з надекспресією *ZWF1*; смугасті стовпчики – рівень рибофлавіну синтезованого штамами з надекспресією *GND1*; білі стовпчики – рівень рибофлавіну синтезованого штамами з посиленою експресією генів *ZWF1* та *GND1*.

Результати цього підпункту представлені у тезах: Andreieva, Y., Liu, W., Dmytruk, K., Sibirny, A. Evaluation of the effect of overexpressed genes *ZWF1* and *GND1* on riboflavin synthesis by flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flarerii*) // 8th International Conference «Human – Nutrition – Environment», October 13-14, Rzeszow, Poland. – 2021. – P. 66.

3.3.2. Вплив надекспресії гена 6-фосфоглюконатдегідрогенази на синтез рибофлавіну дріжджами *C. famata* при культивуванні клітин на YNB з 5% глюкозою та на молочній сироватці

Глюкоза є основним джерелом вуглецю, що використовується у промисловості для вирощування продуцентів рибофлавіну. Проте відомо, що

дріжджі *C. famata* здатні рости на лактозі, використовуючи її як єдине джерело вуглецю (Ishchuk et al., 2008). Нещодавно було досліджено, що деякі штами можуть надпродукувати рибофлавін у лактозовмісному середовищі (Tsyrunyk et al., 2021). Основним і найдешевшим середовищем, що містить близько п'яти відсотків лактози є молочна сироватка, що, зазвичай, утилізується як відходи (Ergüder et al., 2001).

Оскільки штами L20105/GND1, AF-4/GND1 та BRP/GND1 з надекспресією гена 6ФГДГ проявляють здатність до підвищення рівня синтезу рибофлавіну, ми вирішили з'ясувати, як вплине на продукцію зміна середовища культивування.

Виявили, що всі аналізовані штами продукують більше рибофлавіну у середовищі на основі молочної сироватки, аніж на YNB з 5% глюкози. Таким чином, штам L20105/GND1 синтезував у 1,4 рази більше рибофлавіну на молочній сироватці, порівняно із рівнем синтезу на YNB з 5% глюкози. У той же час на сироватці, штам L20105/GND1 синтезує майже вдвічі більше рибофлавіну ніж вихідний штам L20105 (Рис. 3.13, А). Штам AF-4/GND1 продукував на сироватці у 1,7 разів більше рибофлавіну, ніж на YNB з 5% глюкози і у 1,4 рази більше рибофлавіну ніж вихідний штам AF-4 на сироватці (Рис. 3.13, Б).

Трансформант BRP/GND1 здатний синтезувати у 1,3 рази більше рибофлавіну на сироватці ніж штам BRP, на основі якого його було отримано. Також BRP/GND1 синтезує в 1,7 разів більше рибофлавіну порівняно із ростом на YNB з 5% глюкози (Рис. 3.13, Б).

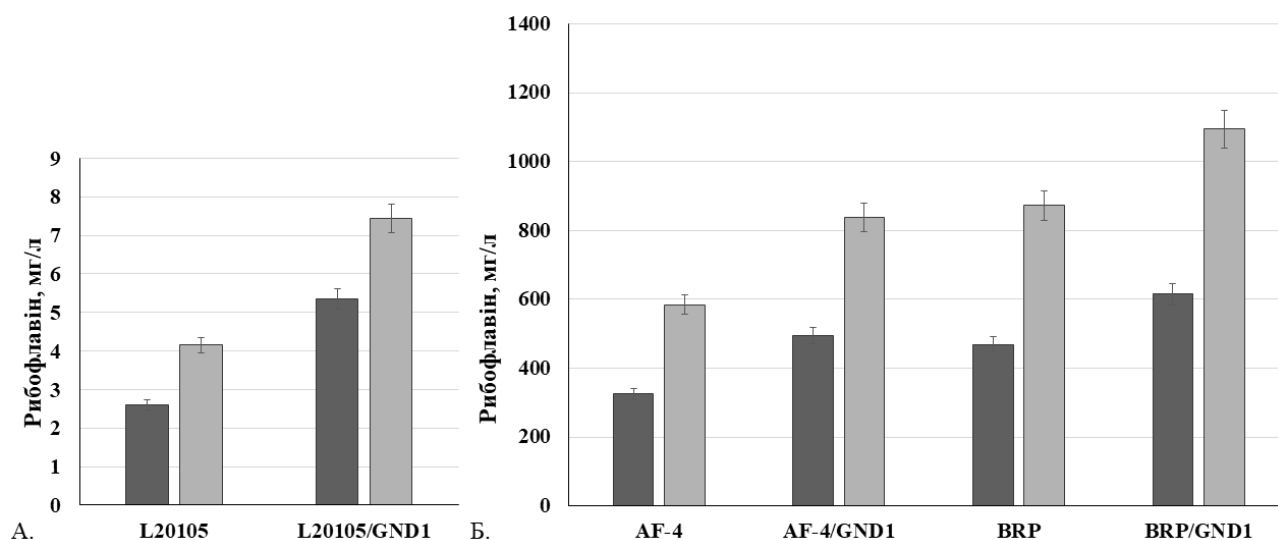


Рис. 3.13. Продукція рибофлавіну штамами *C. famata* L20105, L20105/GND1 (А), AF-4, AF-4/GND1, BRP і BRP/GND1 (Б) за чотири доби культивування в середовищі YNB з 5 % глюкози (темно-сірі стовпці) і на молочній сироватці, з додаванням сульфату амонію (світло-сірі стовпці).

Проте, варто зауважити, що вихід рибофлавіну у міліграмах на грам біомаси зростає лише у штамів L20105 та AF-4/GND1, що пов'язано із значним покращенням ростових характеристик дріжджів при культивуванні на середовищі з лактозою як джерелом Карбону (Рис. 3.14, А, Б).

Отримані дані корисні для подальшої систематизації даних про ймовірні шляхи регуляції синтезу рибофлавіну та запровадження нових способів культивування надпродукуючих трансформантів з метою підвищення виходу рибофлавіну та здешевлення процесу його одержання, особливо, в умовах промисловості.

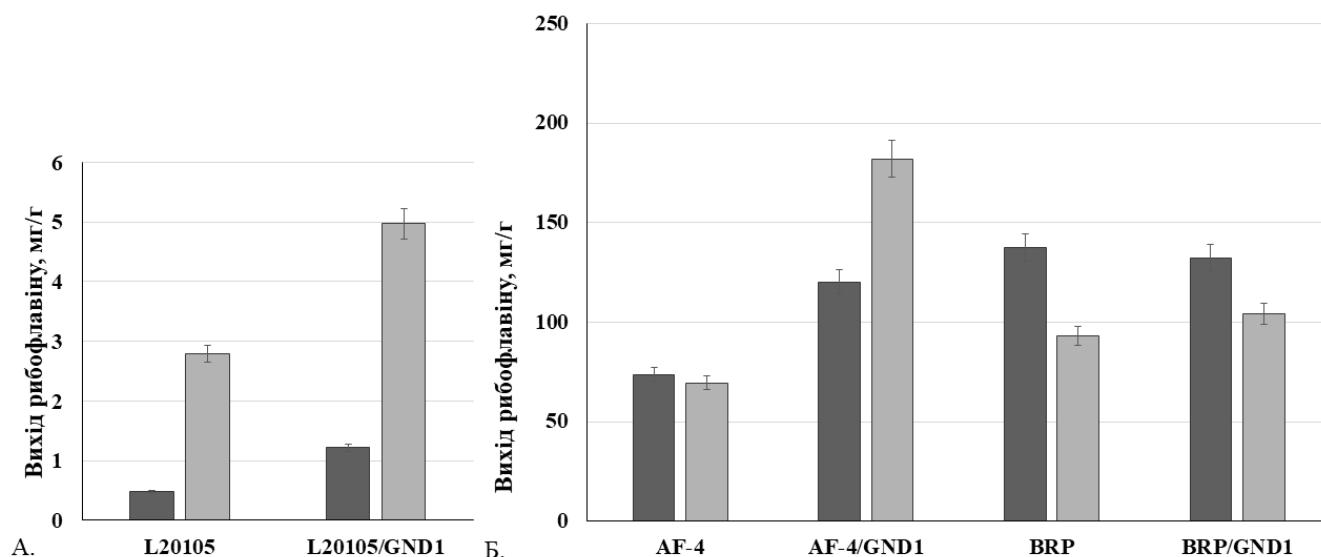


Рис. 3.14. Вихід рибофлавіну у штамів *C. famata* L20105, L20105/GND1 (А), AF-4, AF-4/GND1, BRP і BRP/GND1 (Б) за чотири доби культивування в середовищі YNB з 5% глюкози (темно-сірі стовпчики) і на молочній сироватці, з додаванням сульфату амонію (світло-сірі стовпчики).

Дані цього пункту включені у один із розділів статті під назвою «Cheese Whey Supports High Riboflavin Synthesis by the Engineered Strains of the Flavinogenic Yeast *Candida famata*», що подана до публікації у редакцію журналу «Microbial Cell Factories». Стаття пройшла перший етап рецензії і у відповідь на зауваження рецензентів було подано виправлений варіант статті, що зараз чекає на остаточний висновок щодо прийняття до публікації. Автори публікації: Justyna Ruchala, Yuliia A. Andreieva, Andriy O. Tsyurulnyk, Svitlana M. Sobchuk, Alicja Najdecka, Liu Wen, Yingqian Kang, Olena V. Dmytruk, Kostyantyn V. Dmytruk, Dariya V. Fedorovych, Andriy A. Sibirny.

3.3.3. Посилення експресії Sol3 у дріжджах *C. famata* та аналіз біосинтезу рибофлавіну

Ефективність синтезу рибофлавіну штамми із індукованою експресією гена *ZWF1* є низькою. Надекспресія *GND1* дозволила збільшити концентрацію рибофлавіну, синтезованого дріжджами *C. famata*, але підвищена експресія

обидвох генів не сприяла підвищенню виходу цього метаболіта. Ймовірно, рівень інгібування росту та синтезу флавінів внаслідок підвищення активності Г6ФДГ унеможлиблює надпродукцію вітаміну навіть при дерепресії *GND1*. Перед нами постало завдання пришвидшити потік метаболітів у бік збільшення рівня субстрату для перетворення 6-фосфоглюконолактону до Ру5Ф, а отже, збільшити пул попередника синтезу рибофлавіну. Для цього ми сконструювали плазмиду для надекспресії гена *SOL3*, що кодує фермент 6-фосфоглюконолактазу.

Ген *SOL3* ампліфікували за допомогою ПЛР із використанням геномної ДНК штаму дикого типу *C. famata* VKM Y-9 і пари праймерів Ko1203/Ko1204. Отриманий фрагмент *SOL3* обробляли ендонуклеазами рестрикції BamHI/PstI і клонували у відповідні сайти гідролізу ендонуклеаз рестрикції лінеаризованого вектора pUC57_prTEF1Cf_trTEF1Dh_Ble_Sa, що було використано у попередній частині дисертаційної роботи. Цей експресійний вектор містить промотор *TEF1* *C. famata* та термінатор *D. hansenii*, а, крім того, ген *ble*, що забезпечує стійкість до флеоміцину.

Плазмиду отримала назву pUC57_prTEF1Cf_SOL3Cf_trTEF1Dh_Ble_Sa, або pSOL3 (Рис. 3.15). Отриманий конструкт було введено в геном дріжджів *C. famata* L20105, AF-4, BRP методом електропорації. Проводили селекцію трансформантів на середовищі із флеоміцином. Відібрані трансформанти перевіряли за допомогою методу ПЛР з використанням пари праймерів Ko1056/Ko1205. По три верифіковані трансформанти стабілізували шляхом послідовного вирощування на неселективному та селективному середовищах. Отримані штами найменували L20105/SOL3, AF-4/SOL3 та BRP/SOL3.

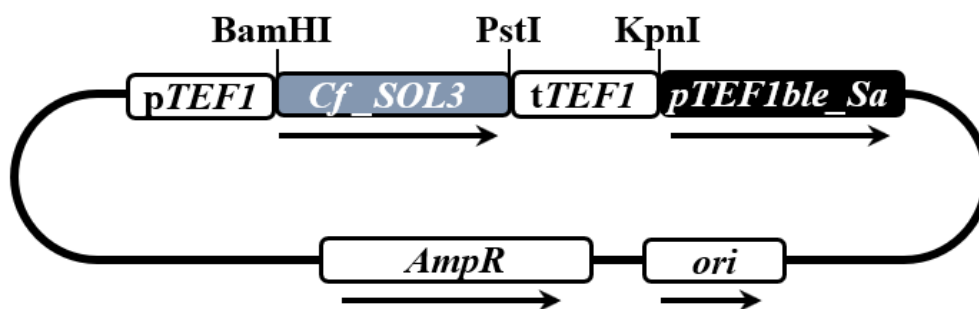


Рис. 3.15. Схема плазмиди pSOL3: *pTEF1ble_Sa* – ген, що забезпечує резистентність до антибіотика флеоміцину, під контролем промотора *TEF1*; *Cf_SOL3* – ген 6-фосфоглюконолактази *C. famata*; *pTEF1* – промотор *TEF1*; *tTEF1* – термінатор *TEF1*; *ori* – точка початку реплікації; *AmpR* – ген стійкості до ампіциліну; Kpn, BamHI, PstI – сайти гідролізу ендонуклеаз рестрикції.

Перевірка фенотипу отриманих трансформантів показала, що лише трансформанти на основі AF-4 синтезували незначно більше рибофлавіну, порівняно із батьківським штамом, а саме у 1,2 рази. Щодо інших трансформантів, то концентрація рибофлавіну у них була близька до такої у вихідних штамів або дещо нижча (Рис. 3.16, Табл. 3.7). Штами вирощували на мінімальному середовищі із додаванням 0,05% дріжджового екстракта. *C. famata* L20105 та трансформанти отримані на основі L20105 культивували на YNB із додаванням лейцину.

З рисунка 3.16. помітно, що надекспресія гена, що кодує 6-фосфоглюконолактазу призводить до мінорного пригнічення росту (Табл. 3.7).

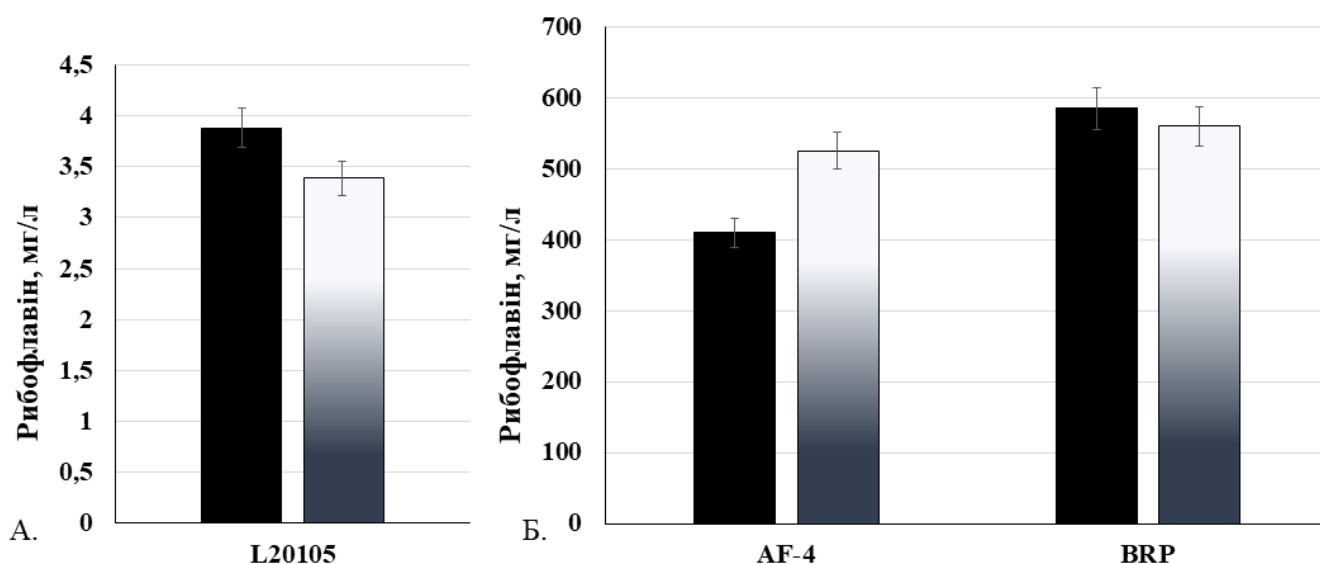


Рис. 3.16. Гістограма продукції рибофлавіну рекомбінантними штамами та вихідними штамами *C. famata* L20105 (А), AF-4 і BRP (Б) на п'ятий день культивування: чорні стовпчики – рівень рибофлавіну синтезованого батьківськими штамами; стовпчики з градієнтом – рівень рибофлавіну синтезованого штамами з надекспресією *SOL3*.

Таблиця 3.7

Біомаса клітин, синтез рибофлавіну та вихід рибофлавіну у рекомбінантних штамів *C. famata* та батьківських штамів на п'ятий день культивування

Штам	Біомаса (г/л)	Рибофлавін (мг/л)	Вихід рибофлавіну (мг/г)
L20105	2,54 ± 0,13	3,88 ± 0,19	1,53 ± 0,07
L20105/SOL3	1,86 ± 0,05	3,39 ± 0,17	1,83 ± 0,09
AF-4	2,33 ± 0,11	410,12 ± 20,05	176,40 ± 8,82
AF4/SOL3	1,96 ± 0,1	525,45 ± 26,2	268,09 ± 13,4
BRP	2,01 ± 0,1	584,9 ± 29,2	291,0 ± 14,55
BRP/SOL3	1,85 ± 0,09	560,15 ± 28,0	302,78 ± 15,13

Хоча отримані дані не показали високого позитивного ефекту внаслідок надекспресії гена *SOL3*, ми не виключаємо, що коекспресія генів *SOL3*, *ZWF1*

та *GND1* стимулюватиме надситнез рибофлавіну. Не зважаючи на те, що надекспресія гена *ZWF1* пригнічує синтез вітаміну B₂, його коекспресія, можливо, допоможе направити більший потік Карбону саме у бік синтезу рибুলозо-5-фосфату.

3.4. Виявлення локалізації білка-екскретази Rfe1 у клітинах дріжджів *C. famata*

Відомо, що культивування флавіногенних дріжджів, здатних до надсинтезу рибофлавіну, супроводжується накопиченням цього вітаміну у культуральній рідині. Це свідчить про існування відповідних механізмів вивільнення синтезованого продукту назовні клітин дріжджів. У деяких дріжджів, включаючи *P. pastoris* та *D. hansenii*, було знайдено гомологи людського гена *BCRP*, що кодує білок екскреції рибофлавіну у ссавців (Mao et al., 2004; Voronovsky et al., 2004; van Herwaarden et al., 2003). Співробітниками нашого інституту було ізольовано відповідний ген із геному *D. hansenii* CBS767 (Voronovsky et al., 2004) і названо *RFE1* (RiboFlavin Excretase). Для того, аби дослідити здатність надсинтезу білка Rfe1 вплинути на вихід рибофлавіну штамми-продуцентами, надекспресували відповідний ген у штама *C. famata* BRP (AF-4/SEF1/RIB1/RIB7), що є найкращим стабільним продуцентом вітаміну B₂ (Dmytruk et al., 2014).

Продукція рибофлавіну в отриманих трансформантах з надекспресією *RFE1* була збільшена майже вдвічі (Tsyurulnyk et al., 2020). Механізм такої істотної активації синтезу рибофлавіну можна інтерпретувати таким чином, що більш ефективне вивільнення внутрішньоклітинного метаболіту з клітини знижує зворотне інгібування синтезу цього продукту, а отже, рівень утворення рибофлавіну зростає (Kiriyaama et al., 2012; Jones et al., 2015).

Наше завдання полягало у тому, аби виявити локалізацію відповідного білка у дріжджів *C. famata*. Щоб прикріпити мітку до білка Rfe1, вирішили використати зелений флуоресцентний білок (GFP – GreenFluorescenceProtein), кодон-оптимізований для дріжджів. Ген білка було ампліфіковано праймерами

Ko1043/Ko1044 із плазмиди pGFP (Barelle et al., 2004). Для ампліфікації плазмиди pRFE1 (попередньо створеної для надекспресії гена *RFE1*) використовували праймери Ko1045 і Ko1046. Плазмиди pGFP і pRFE1 були гідролізовані ендонуклеазами рестрикції SalI/PstI і ліговані для створення плазмиди pRFE1-G. У результаті, плазміда містила мітку GFP зливу із карбоксильним кінцем гена *RFE1*. Крім того, плазміда, що була використана у якості вектора, вже містила маркер стійкості до антибіотика флеоміцину *ble* (Рис. 3.17). Сконструйовану плазмиду лінеаризували за сайтом AatII та використовували для трансформації дріжджів *C. famata* L20105. Первинна селекція трансформантів проводилася на багатому середовищі YPD із додаванням флеоміцину. Наявність плазмиди в геномі трансформантів L20105/RFE1-GFP було верифіковано за допомогою ПЛР з парою праймерів Ko1043/Ko1044.

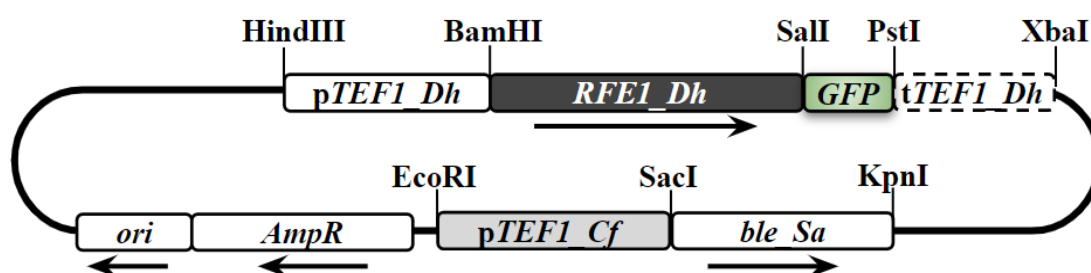


Рис. 3.17. Схема плазмиди pRFE1-G: *pTEF1_Dh* та *tTEF1_Dh* – промотор та термінатор гена *TEF1 D. hansenii*; *RFE1_Dh* – ген *RFE1*; *GFP* – ген для флуоресцентного мічення; *ble_Sa* – ген стійкості до флеоміцину зі *S. aureus*; *ori* – точка початку реплікації; *AmpR* – ген стійкості до ампіциліну; HindIII, BamHI, SalI, PstI, XbaI, EcoRI, SacI, KpnI – сайти гідролізу ендонуклеаз рестрикції.

Подальше підтвердження наявності флуоресцентної мітки у трансформантів L20105/RFE1-GFP здійснювали за допомогою метода флуоресцентної мікроскопії. Rfe1-GFP білок помітний у вигляді зелених крапок по периферії клітин (Рис. 3.18, Б). Стверджувати про конкретну локалізацію цього білка у плазматичній мембрані чи інших структурах клітини зараз не можемо, оскільки у дріжджів *C. famata* досі не вивчено жодного транспортера

плазматичної мембрани, з яким можна було б провести порівняння. Фарбування методом DAPI (4',6-діаміно-2-фенондіолом, 4',6-diamidino-2-phenylindole) додатково підтвердило, що білок не локалізується в ядрі (Рис. 3.18, В).

Попередні припущення колег із Інституту біології клітини, що працювали над отриманням штамів із надекспресією гена *RFE1* схилялися до того, що білок Rfe1 міг впливати на експресію структурних генів синтезу рибофлавіну шляхом його безпосередньої взаємодії з генами-мішенями (Tsyurulnyk et al., 2020). Таку гіпотезу було висловлено зважаючи на те, що експериментальні дані підтверджують здатність деяких білків плазматичної мембрани проникати у ядро (Liu et al., 2018). Але наявність Rfe1 у ядерній мембрані було експериментально спростовано. Крім того, рибофлавін-екскретаза не містить ДНК-зв'язувальних доменів.

Однак співробітники Інституту біології клітини, відділу МГіБ роблять також інше припущення. Регуляція експресії генів *RIB1* і *RIB6* у бік зростання в отриманого співробітниками штама-надпродуцента BRP/RFE1 може бути пов'язана зі значно зниженим вмістом внутрішньоклітинного рибофлавіну. Ймовірно, зниження вмісту рибофлавіну у клітині дріжджів корелює із підвищенням рівня експресії структурних генів флавіногенезу. Така гіпотеза є досить вірогідною з огляду на те, що відповідна закономірність відома для бактерійних організмів (Abbas and Sibirny, 2011).

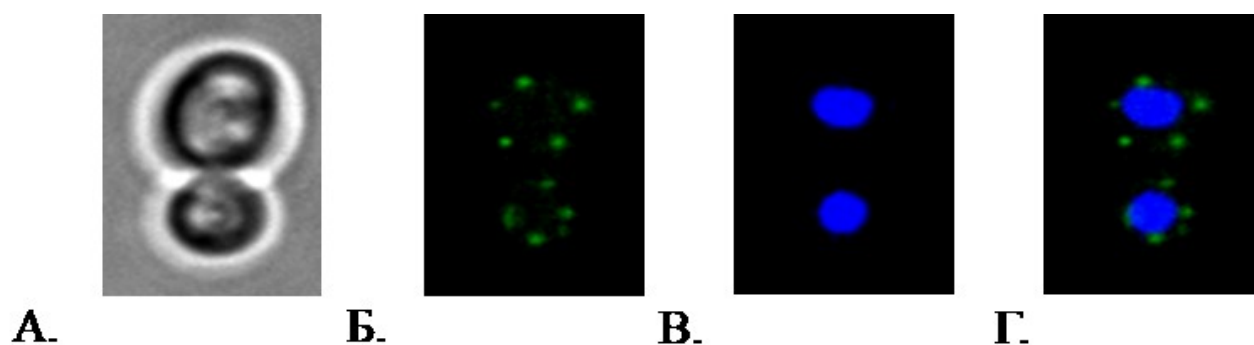


Рис. 3.18. Зображення флуоресцентної мікроскопії клітин *C. famata* штаму L20105/RFE1-GFP, вирощених на YNB середовищі протягом 18 годин: А – DIC – клітини у диференційному інтерференційному контрасті (differential interference contrast); Б – Rfe1-GFP – свічення міченого білка GFP у клітинах під час флуоресцентної мікроскопії; В – DAPI – зразок, фарбований методом DAPI (свічення зафарбованих ядер); Г – DAPI/GFP – накладання зображень флуоресцентної мікроскопії та фарбування методом DAPI.

Результати цього підпункту висвітлені як частина роботи у статті: Tsyurulnyk, A. O., **Andreieva, Y. A.**, Ruchala, J., Fayura, L. R., Dmytruk, K. V., Fedorovych, D. V., and Sibirny, A. A. (2020). 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*, 37(9–10), 467–473. <https://doi.org/10.1002/yea.3470>.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Флавіні є необхідним компонентом живлення усіх, прокаріотичних та еукаріотичних організмів. Тварини, люди та деякі бактерії є ауксотрофами за рибофлавіном. Серед бактерій, зокрема, ауксотрофами за рибофлавіном є *Corynebacterium pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, деякі молочнокислі бактерії, мікоплазми, спірохети та рикетсії (Fraga and Reddy, 1982; Koser, 1968; Siddiqi and Khan, 1982; Terrade and Mira, 2009; Vitreschak et al., 2002). Усі дріжджі та міцелярні гриби здатні до біосинтезу рибофлавіну.

Завдяки поступу у вивченні флавіногенезу впродовж чотирьох останніх десятиліть вдалося розкрити багато деталей цього процесу та шляхів його регуляції. Проте регуляція синтезу рибофлавіну флавіногенними дріжджами *C. famata* вивчена недостатньо. Таким чином, на сьогоднішній день, мікробіологічний синтез вітаміну B₂ запроваджено у промисловості із використанням грам-позитивних бактерій *B. subtilis* та цвілевих грибів *A. gossypii*. Щодо дріжджів *C. famata*, то, на жаль, зараз їхні похідні надпродуценти не є конкурентноздатними. Сильний продуцент рибофлавіну, отриманий методом класичного мутагенезу, *C. famata* der8 був усунутий з виробництва через його нестабільність. Тому, ми вбачаємо доцільною поставлену у цій дисертації мету, а саме – ідентифікація та з'ясування принципів дії факторів, залучених у процеси біосинтезу рибофлавіну флавіногенними дріжджами *C. famata*.

Перші подібні кроки вже здійснено під час отримання стабільного штаму AF-4 за допомогою кількох етапів класичного мутагенезу, та подальшого його удосконалення шляхом надекспресії основних структурних генів синтезу рибофлавіну *RIB1*, *RIB7* та гена *SEF1*, що залучений у позитивну регуляцію цього процесу (Dmytruk et al., 2011; 2014). У результаті таких модифікацій створено стабільний штам BRP, що синтезує 1,6 г рибофлавіну /л.

Експерименти даної дисертаційної роботи полягали у подальшому аналізі ролі *Sef1* у флавіногенезі та ролі, що відіграє у цьому процесі промотор цього гена. Як ми вже обговорювали вище, *Sef1* є транскрипційним фактором, який відіграє центральну роль у біосинтезі рибофлавіну та метаболізмі заліза у *C. famata* та *C. albicans* (Abbas and Sibirny, 2011). Ми виявили, що промотори *SEF1* із флавіногенних дріжджів *C. albicans* та *C. tropicalis*, злиті з ВРЗ гена *SEF1* із *C. famata*, відновлюють надсинтез рибофлавіну в *sef1Δ*.

Розуміння функції та регулювання *Sef1* надає потужний інструмент для посилення виробництва рибофлавіну. З іншого боку, максимальний потенціал експресії *SEF1* не відомий. Відкриття ролі *SEF1* у надсинтезі рибофлавіну дало унікальну можливість удосконалити штами *C. famata* шляхом формування регуляторної мережі на користь надлишкового утворення рибофлавіну.

Здатність до посиленої продукції рибофлавіну в промислових штамів, ймовірно, пов'язана не лише з мутаціями окремих генів, а також може залежати не тільки від структурних генів, які безпосередньо беруть участь у біосинтезі рибофлавіну. Це чітко продемонстровано раніше шляхом інсерційного мутагенезу *MET2* (Dmytruk et al., 2006), а у цій роботі – делецією *VMA1*. Ми можемо лише здогадуватися про роль *VMA1* в утворенні вітаміну В₂, але його видалення може бути використане для створення більш ефективних промислових продуцентів.

Досі ще не було досліджено впливу накопичення аліфатичного попередника рибулозо-5-фосфату на синтез рибофлавіну. Існуючі дослідження фокусувалися на збільшенні пулу іншого попередника вітаміну В₂ – ГТФ. Ми з'ясували, що дерепресія гена 6ФГДГ підвищує здатність дріжджів до надпродукції рибофлавіну майже вдвічі. Надекспресія гена фермента Г6ФДГ, навпаки, інгібує флавіногенез та ростові процеси загалом. Ми припускаємо, що таке пригнічення спричинено накопиченням у дріжджах 6-фосфоглюконату так, що кислотність внутрішньоклітинного середовища пригнічує їхню нормальну життєдіяльність. Навіть при посиленій експресії обидвох генів, *ZWF1* та *GND1*, позитивний ефект від дерепресії *GND1* нівелюється, тому, такі трансформанти

демонструють лише мінорне збільшення кількості флавінів. У наших планах – детальніше дослідити вплив коекспресії генів *SOL3*, *ZWF1* та/або *GND1*. Завдяки отриманню та аналізу штамів із надекспресією гена *SOL3* ми побачили незначний позитивний вплив на стимулювання утворення рибофлавіну у трансформанта на основі AF-4. Але трансформанти на основі штамів L20105 та BRP не проявляли таких характеристик. Причину таких відмінностей поки що не встановлено, проте це може бути цікавим питанням для дослідження. Підходи метаболічної інженерії, описані нами в роботі, удосконалення знань та відповідна модифікація ПФШ можливо, стануть корисними в розробці надсинтетиків рибофлавіну.

Відомо, що гриби *A. gossipi* здатні надсинтезувати рибофлавін при рості на молочній сироватці (Ertrk et al., 1998). Частиною нашого завдання було виявити, чи здатні, сконструйовані нами штами, що характеризуються збільшеним виходом рибофлавіну, синтезувати ще більше вітаміну B₂ при зміні середовища культивування. Як результат, вирощування штамів з надекспресією гена *GND1* на сироватці сприяло ще більш інтенсивному утворенню вітаміну B₂. Ми розглядаємо використання сироватки, що містить лактозу в невисокій концентрації у якості заміни глюкозних середовищ, що зараз використовуються в промисловості. При виробництві лише один кг сиру отримується близько дев'яти кг сироватки, що не має цінності для подальшого застосування, бо містить лише 6-7% корисної молочної маси. Отже, стає не вигідно залучати цю сировину у подальше виробництво молочних продуктів. Але відпрацьована сироватка є одним з найбільш забруднюючих відходів виробництва сиру. Вона характеризується високим рівнем хімічного споживання кисню (ХСК) і біохімічної потреби в кисні (БПК), високим вмістом жирів, завислих твердих частинок, фосфору та азоту (Prazeres et al., 2016). Через вищезгаданий склад відходи сироватки становлять значний ризик для навколишнього середовища при викиді безпосередньо у водотік (Poništ et al., 2022).

У роботі виявлено локалізацію білка-екскретази рибофлавіну у дріжджів *C. famata* Rfe1. Цей транспортер працює по периферії клітин. Як відомо із

роботи наших співробітників, внаслідок надекспресії гена *RFE1* відбувається зниження кількості внутрішньоклітинного рибофлавіну, та водночас, надекспресія генів *RIB1* та *RIB6* (Tsygulnyk et. al., 2020). Можливо, в клітинах *C. famata* працює непряма активація транскрипційних факторів, залучених у шлях флавіногенезу, за рахунок зниження внутрішньоклітинної концентрації вітаміну B₂.

Останні дослідження з генної інженерії дріжджів, такі як адаптація системи CRISPR-Cas9, роблять *C. famata* привабливим господарем для подальшого вдосконалення виробництва не лише рибофлавіну, але й його похідних – ФМН, ФАД та розеофлавіну. Розкриті нами феномени можуть бути використані для конструювання більш ефективних продуцентів рибофлавіну.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі ідентифіковано та з'ясовано закономірності дії низки чинників, залучених у регуляцію біосинтезу рибофлавіну у дріжджів *C. famata*. Це дало можливість запропонувати нові підходи до конструювання поліпшених продуцентів рибофлавіну на основі цих флавіногенних дріжджів.

Головні наукові і практичні результати роботи викладено у наступних висновках.

1. Сконструйовано штам *C. famata Δvma1* із пошкодженим геном α субодиниці вакуолярної АТФ-ази. Встановлено, що *Vma1* здійснює негативну регуляцію синтезу рибофлавіну. Штам *Δvma1* характеризується у дев'ять разів більшою продукцією рибофлавіну ніж у вихідного штама.

2. Вивчено вплив промоторів гена-активатора транскрипції *SEF1* на біосинтез рибофлавіну *C. famata*. З'ясовано, що промотори *SEF1* із флавіногенних дріжджів *C. albicans* та *C. tropicalis*, злиті з ВРЗ гена *SEF1* *C. famata*, відновлюють здатність до надпродукції рибофлавіну у штаму *sef1Δ*, на відміну від промоторів цього гена з нефлавіногенних дріжджів *S. stipitis* та *S. cerevisiae*.

3. Вперше досліджено вплив посилення експресії генів *ZWF1*, *SOL3* та *GND1*, які кодують ферменти окиснювального етапу пентозофосфатного шляху, на синтез рибофлавіну штамом дикого типу *C. famata* та надсинтетиками цього вітаміну:

- Надекспресія гена 6-фосфоглюконатдегідрогенази *GND1* підвищує продукцію рибофлавіну *C. famata* L20105 в два рази та в 1,3 – 1,5 рази у надпродуцентів рибофлавіну BRP, AF-4. Використання лактози як джерела Карбону веде до зростання синтезу рибофлавіну цими штамми у 1,4 – 2 рази;

- Надекспресія гена 6-фосфоглюконолактонази *SOL3* веде до зростання продукції рибофлавіну у 1,3 рази порівняно із вихідним штамом AF-4. У інших штамів L20105 та BRP надекспресія не призводила до підвищення рівня синтезу рибофлавіну;

- Надекспресія гена *ZWF1* (кодує глюкозо-6-фосфатдегідрогенази), навпаки, пригнічує ріст і синтез вітаміну В₂ дріжджами *C. famata*.
- 4. Встановлено, що транспортер рибофлавіну, білок-екскретаза Rfe1 локалізований поза ядром клітин дріжджів *C. famata*, по її периферії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бабяк, Л. Я., Протченко, О. В., та Федорович, Д. В. (2001). Координована регуляція біосинтезу вітаміну В2 (рибофлавіну) та асиміляції заліза у дріжджів. *Генетика і Селекція в Україні На Межі Тисячоліть*, 1, 457–461.
2. Звягільська, Р. А., Федорович, Д. В., та Шавловський, Г. М. (1978). Дихальна система дріжджів *Pichia guilliermondii* за різних рівнів флавіногенезу. *Мікробіологія*, 47(6), 975–984.
3. Федорович, Д. В., Шавловський, Г. М., та Протченко, О. В. (1992). Фериредуктазна активність клітин *Pichia guilliermondii* та особливості її регуляції. *Мікробіологія*, 61(1), 11–17.
4. Шавловський, Г. М., Кузнецова, Р. А., Логвиненко, Е. М., та Струговщикова, Л. П. (1974). Про роль метаболізму гуанілових сполук у надсинтезі рибофлавіну у дріжджів. *Вітаміни*, 7, 110–118.
5. Abbas, C. A., and Sibirny, A. A. (2011). Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 321–360. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00030-10>
6. Acevedo-Rocha, C. G., Gronenberg, L. S., Mack, M., Commichau, F. M., and Genee, H. J. (2019). Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.006>
7. Amornrattanapan, P. (2013). Riboflavin production by *Candida tropicalis* isolated from seawater. *Scientific Research and Essays*, 8, 43–47. <https://doi.org/10.5897/SRE12.603>
8. Andreieva, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020a). *SEF1* and *VMA1* Genes Regulate Riboflavin Biosynthesis in the Flavinogenic Yeast *Candida famata*. *Cytology and Genetics*, 54(5), 379–385. <https://doi.org/10.3103/s0095452720050023>

9. Andreieva, Y., Petrovska, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020b). Role of the regulatory genes *SEF1*, *VMA1* and *SFUI* in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) . *Yeast*, 37(9–10), 497–504. <https://doi.org/10.1002/yea.3503>
10. Araki, S., Suzuki, M., Fujimoto, M., and Kimura, M. (1995). Enhancement of resistance to bacterial infection in mice by vitamin B₂. *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 599–602.
11. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. (Eds.). (2003). Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Association at Wiley Interscience. In *Molecular Reproduction and Development* (p. 146). John Wiley & Sons, Inc.
12. Averianova, L. A., Balabanova, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., and Tekutyeva, L. A. (2020). Production of Vitamin B₂ (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>
13. Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997). Regulation of Mitochondrial Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of Frataxin. *Science*, 276(5319), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1709>
14. Bacher, A. (1991). Biosynthesis of Flavins. In F. M€uller (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (1st ed., pp. 215–249). CRC Press.
15. Bacher, A., Richter, G., Ritz, H., Eberhardt, S., Fischer, M., and Krieger, C. (1997). Biosynthesis of riboflavin: GTP cyclohydrolase II, deaminase, and reductase. *Methods in Enzymology*, 382–389. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(97\)80129-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)80129-2)
16. Barelle, C. J., Manson, C. L., MacCallum, D. M., Odds, F. C., Gow, N. A. R., and Brown, A. J. P. (2004). GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans*. *Yeast*, 21(4), 333–340. <https://doi.org/10.1002/yea.1099>

17. Barrick, J. E., and Breaker, R. R. (2007). The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biology*, 8(11), R239. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-11-r239>
18. Basset, G., Quinlivan, E. P., Ziemak, M. J., Díaz De La Garza, R., Fischer, M., Schiffmann, S., Bacher, A., Gregory, J. F., and Hanson, A. D. (2002). Folate synthesis in plants: The first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12489–12494. <https://doi.org/10.1073/pnas.192278499>
19. Bauer, S., Kemter, K., Bacher, A., Huber, R., Fischer, M., and Steinbacher, S. (2003). Crystal Structure of *Schizosaccharomyces pombe* Riboflavin Kinase Reveals a Novel ATP and Riboflavin-Binding Fold. *Journal of Molecular Biology*, 326(5), 1463–1473. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00059-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00059-7)
20. Belenky, P., Stebbins, R., Bogan, K. L., Evans, C. R., and Brenner, C. (2011). Nrt1 and Tna1-Independent Export of NAD⁺ Precursor Vitamins Promotes NAD⁺ Homeostasis and Allows Engineering of Vitamin Production. *PLoS ONE*, 6(5), e19710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019710>
21. Bergmeyer, H., and Gawehn, K. (Eds.). (1974). Methods of enzymatic analysis [E-book]. In *Determination of Enzyme Activities* (2nd ed., Vol. 4, p. 12). Academic Press.
22. Beztsinna, N., Solé, M., Taib, N., and Bestel, I. (2016). Bioengineered riboflavin in nanotechnology. *Biomaterials*, 80, 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.050>
23. Blazeck, J., Hill, A., Liu, L., Knight, R., Miller, J., Pan, A., Otoupal, P., and Alper, H. S. (2014). Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms4131>
24. Blazeck, J., Liu, L., Redden, H., and Alper, H. (2011). Tuning Gene Expression in *Yarrowia lipolytica* by a Hybrid Promoter Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7905–7914. <https://doi.org/10.1128/aem.05763-11>

25. Blazeck, J., Reed, B., Garg, R., Gerstner, R., Pan, A., Agarwala, V., and Alper, H. S. (2012). Generalizing a hybrid synthetic promoter approach in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(7), 3037–3052. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4421-5>
26. Boretsky, Y., Kapustyak, K., Fayura, L., Stasyk, O., Stenchuk, M., Bobak, Y., Drobot, L., and Sibirny, A. (2005). Positive selection of mutants defective in transcriptional repression of riboflavin synthesis by iron in the flavinogenic yeast. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.03.007>
27. Boretsky, Y. R., Pynyaha, Y. V., Boretsky, V. Y., Fedorovych, D. V., Fayura, L. R., Protchenko, O., Philpott, C. C., and Sibirny, A. A. (2011). Identification of the genes affecting the regulation of riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii* using insertion mutagenesis. *FEMS Yeast Research*, 11(3), 307–314. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00720.x>
28. Bowman, B. J., and Bowman, E. J. (1986). H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *The Journal of Membrane Biology*, 94(2), 83–97. <https://doi.org/10.1007/bf01871190>
29. Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Götze, E., Herrmann, A., Gütlich, M., and Bacher, A. (1998). Biosynthesis of Pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 28132–28141. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28132>
30. Braden, B. C., Velikovsky, C., Cauerhff, A. A., Polikarpov, I., and Goldbaum, F. A. (2000). Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*. Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 297(5), 1031–1036. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3640>
31. Breaker, R. R. (2006). *Riboswitches and the RNA world* (R. F. Gesteland, T. R. Cech, and J. F. Atkins, Eds.; 3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

32. Breaker, R. R. (2010). Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003566>
33. Burrows, R. B., and Brown, G. M. (1978). Presence of *Escherichia coli* of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *Journal of Bacteriology*, 136(2), 657–667. <https://doi.org/10.1128/jb.136.2.657-667.1978>
34. Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A. S., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., Agrafioti, I., Arnaud, M. B., Bates, S., Brown, A. J. P., Brunke, S., Costanzo, M. C., Fitzpatrick, D. A., de Groot, P. W. J., Harris, D., Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247), 657–662. <https://doi.org/10.1038/nature08064>
35. Buzzini, P., and Rossi, J. (1998). Semi-continuous and continuous riboflavin production by calcium-alginate-immobilized *Candida tropicalis* in concentrated rectified grape must. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(3), 377–381. <https://doi.org/10.1023/a:1008865228260>
36. Callahan, S. M., and Dunlap, P. V. (2000). LuxR- and Acyl-Homoserine-Lactone-Controlled Non- *lux* Genes Define a Quorum-Sensing Regulon in *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2811–2822. <https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2811-2822.2000>
37. Cerletti, P., Strom, R., Giordano, M. G., Barra, D., and Giovenco, S. (1965). Flavin coenzymes, flavinogenesis and reproduction in *Ashbya gossypii*. *J. Biochem*, 57, 773–786.
38. Chen, C., Pande, K., French, S., Tuch, B., and Noble, S. (2011). An Iron Homeostasis Regulatory Circuit with Reciprocal Roles in *Candida albicans* Commensalism and Pathogenesis. *Cell Host andamp; Microbe*, 10(2), 118–135. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.07.005>
39. Dmytruk, K. V., Abbas, C. A., Voronovsky, A. Y., Kshanovska, B. V., Sybirna, K. A., and Sybirny, A. A. (2004). Cloning of structural genes involved in riboflavin synthesis of the yeast *Candida famata*. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal*, 76(1), 78–87.

40. Dmytruk, K., Lyzak, O., Yatsyshyn, V., Kluz, M., Sibirny, V., Puchalski, C., and Sibirny, A. (2014). Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production. *Journal of Biotechnology*, 172, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.12.005>
41. Dmytruk, K. V., Ruchala, J., Fedorovych, D. V., Ostapiv, R. D., and Sibirny, A. A. (2020). Modulation of the Purine Pathway for Riboflavin Production in Flavinogenic Recombinant Strain of the Yeast *Candida famata*. *Biotechnology Journal*, 15(7), 1900468. <https://doi.org/10.1002/biot.201900468>
42. Dmytruk, K. V., and Sibirny, A. A. (2012). *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*, 29(11), 453–458. <https://doi.org/10.1002/yea.2929>
43. Dmytruk, K. V., Voronovsky, A. Y., and Sibirny, A. A. (2006). Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. *Current Genetics*, 50(3), 183–191. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0083-0>
44. Dmytruk, K. V., Yatsyshyn, V. Y., Sybirna, N. O., Fedorovych, D. V., and Sibirny, A. A. (2011). Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production. *Metabolic Engineering*, 13(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.005>
45. Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., de Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), 35–44. <https://doi.org/10.1038/nature02579>
46. Dym, O., and Eisenberg, D. (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science*, 10(9), 1712–1728. <https://doi.org/10.1110/ps.12801>
47. Efimov, I., Kuusk, V., Zhang, X., and McIntire, W. S. (1998). Proposed Steady-State Kinetic Mechanism for *Corynebacterium ammoniagenes* FAD

Synthetase Produced by *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 37(27), 9716–9723. <https://doi.org/10.1021/bi972817j>

48. Eggersdorfer, M., Laudert, D., Létinois, U., McClymont, T., Medlock, J., Netscher, T., and Bonrath, W. (2012). One Hundred Years of Vitamins-A Success Story of the Natural Sciences. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(52), 12960–12990. <https://doi.org/10.1002/anie.201205886>

49. Ergüder, T., Tezel, U., Güven, E., and Demirer, G. (2001). Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Management*, 21(7), 643–650. [https://doi.org/10.1016/s0956-053x\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/s0956-053x(00)00114-8)

50. Ertrk, E., Erkmen, O., and Oner, M. D. (1998). Effects of Various Supplements on Riboflavin Production by *Ashbya gossypii* in Whey. *Turk J Eng Environm Sci*, 22, 371–376.

51. Fedorovich, D. V., Kityk, I. V., Dzhala, V. I., Protchenko, O. V., and Shavlovskii, G. M. (1997). Accumulation and redox transformations of iron on the yeast *Pichia guilliermondii* and its flavinogenic mutants. *Mikrobiologiya*, 66, 60–62.

52. Fischer, M., and Bacher, A. (2005). Biosynthesis of flavocoenzymes. *Natural Product Reports*, 22(3), 324. <https://doi.org/10.1039/b210142b>

53. Fischer, M., and Bacher, A. (2006). Biosynthesis of vitamin B2 in plants. *Physiologia Plantarum*, 126(3), 304–318. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00607.x>

54. Fischer, M., and Bacher, A. (2010). Riboflavin biosynthesis. In L. N. Mander and H. Liu (Eds.), *Comprehensive natural products II: Chemistry and biology* (1st ed., Vol. 7, pp. 3–36). Elsevier.

55. Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Schramek, N., Köhler, P., Schieberle, P., and Bacher, A. (2005). Evolution of vitamin B₂ biosynthesis: riboflavin synthase of *Arabidopsis thaliana* and its inhibition by riboflavin. *Biological Chemistry*, 386(5). <https://doi.org/10.1515/bc.2005.050>

56. Fischer, M., Römisch, W., Saller, S., Illarionov, B., Richter, G., Rohdich, F., Eisenreich, W., and Bacher, A. (2004). Evolution of Vitamin B₂

Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36299–36308.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m404406200>

57. Fisk, D. G., Ball, C. A., Dolinski, K., Engel, S. R., Hong, E. L., Issel-Tarver, L., Schwartz, K., Sethuraman, A., Botstein, D., and Michael Cherry, J. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. *Yeast*, 23(12), 857–865. <https://doi.org/10.1002/yea.1400>

58. Foor, F., and Brown, G. M. (1975). Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(9), 3545–3551

59. Forgac, M. (1989). Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiological Reviews*, 69(3), 765–796. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.765>

60. Förster, C., Santos, M. A., Ruffert, S., Krämer, R., and Revuelta, J. L. (1999). Physiological Consequence of Disruption of the *VMA1* Gene in the Riboflavin Overproducer *Ashbya gossypii*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9442–9448. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9442>

61. Fraga, A. M., and Reddy, C. A. (1982). Nutritional requirements of *Corynebacterium pyogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(2), 334–340. <https://doi.org/10.1128/jcm.16.2.334-340.1982>

62. Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H., and Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Molecular and General Genetics MGG*, 198(1), 179–182. <https://doi.org/10.1007/bf00328721>

63. Graupner, M., Xu, H., and White, R. H. (2002). The Pyrimidine Nucleotide Reductase Step in Riboflavin and F 420 Biosynthesis in *Archaea* Proceeds by the Eukaryotic Route to Riboflavin. *Journal of Bacteriology*, 184(7), 1952–1957. <https://doi.org/10.1128/jb.184.7.1952-1957.2002>

64. Grochowski, L. L., Xu, H., and White, R. H. (2009). An Iron(II) Dependent Formamide Hydrolase Catalyzes the Second Step in the Archaeal

Biosynthetic Pathway to Riboflavin and 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin. *Biochemistry*, 48(19), 4181–4188. <https://doi.org/10.1021/bi802341p>

65. Groenewald, M., Daniel, H. M., Robert, V., Poot, G., and Smith, M. (2008). Polyphasic re-examination of *Debaryomyces hansenii* strains and reinstatement of *D. hansenii*, *D. fabryi* and *D. subglobosus*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 21(1), 17–27. <https://doi.org/10.3767/003158508x336576>

66. Groom, K. R., Heyman, H. C., Steven, M. C., Hawkins, L., and Martin, M. C. (1998). *Kluyveromyces lactis* *SEF1* and its *Saccharomyces cerevisiae* homologue bypass the unknown essential function, but not the Mitochondrial RNase P function, of the *S. cerevisiae* RPM2 Gene. *Yeast*, 14. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980115\)14:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1)

67. Guilliermond, A., Fontaine, M., and Raffy, A. (1935). Sur l'existence dans l'*Eremothecium ashbyii* d'un pigment jaune se rapportant au groupe des flavines. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 201, 1077–1080. [in French]

68. Gupta, M., and Outten, C. E. (2020). Iron–sulfur cluster signaling: The common thread in fungal iron regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 55, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.02.008>

69. Gusarov, I. I., Kreneva, R. A., Rybak, K. V., Podcherniaev, D. A., Iomantas, I., Kolibaba, L. G., Polanuer, B. M., and Perumov, D. A. (1997). Primary structure and functional activity of the *Bacillus subtilis* *ribC* gene. *Molekuliarnaia Biologiia*, 31(5), 820–825.

70. Herz, S., Eberhardt, S., and Bacher, A. (2000). Biosynthesis of riboflavin in plants. The *ribA* gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry*, 53(7), 723–731. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00013-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00013-3)

71. Hickey, R. J. (1945). The inactivation of iron by 2,2-bipyrimidine and its effect on riboflavin synthesis by *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Biochem*, 8, 439–447.

72. Hollander, I., and Brown, G. M. (1979). Biosynthesis of riboflavin: Reductase and deaminase of *Ashbya gossypii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 89(2), 759–763. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(79\)90694-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(79)90694-6)
73. Ikeya, N., and Woodward, J. R. (2021). Cellular autofluorescence is magnetic field sensitive. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(3). <https://doi.org/10.1073/pnas.2018043118>
74. Ishchuk, O. P., Dmytruk, K. V., Rohulya, O. V., Voronovsky, A. Y., Abbas, C. A., and Sibirny, A. A. (2008). 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*, 42(3), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.09.008>
75. Jiménez, A., Santos, M. A., Pompejus, M., and Revuelta, J. L. (2005). Metabolic Engineering of the Purine Pathway for Riboflavin Production in *Ashbya gossypii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5743–5751. <https://doi.org/10.1128/aem.71.10.5743-5751.2005>
76. Jiménez, A., Santos, M. A., and Revuelta, J. L. (2008). Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase activity affects growth and riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *BMC Biotechnology*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-67>
77. Johnston, J. R. (Ed.). (1994). Molecular genetics of yeast: a practical approach. In *Molecular genetics of yeast* (Vol. 89, pp. 296–300). IRL Press at Oxford University Press.
78. Jones, C. M., Hernández Lozada, N. J., and Pfleger, B. F. (2015). Efflux systems in bacteria and their metabolic engineering applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9381–9393. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6963-9>
79. Kabani, M., Beckerich, J. M., and Brodsky, J. L. (2002). Nucleotide Exchange Factor for the Yeast Hsp70 Molecular Chaperone Ssa1p. *Molecular and Cellular Biology*, 22(13), 4677–4689. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.13.4677-4689.2002>

80. Kato, T., and Park, E. Y. (2012). Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Biotechnology Letters*, 34(4), 611–618. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0833-z>
81. Keller, P. J., le Van Quang, Kim, S. U., Bown, D. H., Chen, H. C., Kohnle, A., Bacher, A., and Floss, H. G. (1988). Biosynthesis of riboflavin: mechanism of formation of the ribitylamino linkage. *Biochemistry*, 27(4), 1117–1120. <https://doi.org/10.1021/bi00404a006>
82. Kil, Y. V., Mironovi, V. N., Gorishin, I. Y., Kreneva, R. A., and Perumov, D. A. (1992). Riboflavin operon of *Bacillus subtilis*: unusual symmetric arrangement of the regulatory region. *Molecular and General Genetics MGG*, 233(3), 483–486. <https://doi.org/10.1007/bf00265448>
83. Kiriyaama, K., Hara, K. Y., and Kondo, A. (2012). Extracellular glutathione fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel glutathione exporter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 1021–1027. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4075-3>
84. Knight, S. A. B., Lesuisse, E., Stearman, R., Klausner, R. D., and Dancis, A. (2002). Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. *Microbiology*, 148(1), 29–40. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-29>
85. Koser, S. A. (1968). *Vitamin requirements of bacteria and yeasts* (C. T. Charles, Ed.; 3rd ed.). Springfield.
86. Lee, C. Y., and Meighen, E. A. (1992). The *lux* genes in *Photobacterium leiognathi* are closely linked with genes corresponding in sequence to riboflavin synthesis genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 186(2), 690–697. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)90802-r](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)90802-r)
87. Lee, C. Y., O’Kane, D. J., and Meighen, E. A. (1994). Riboflavin synthesis genes are linked with the *lux* operon of *Photobacterium phosphoreum*. *Journal of Bacteriology*, 176(7), 2100–2104. <https://doi.org/10.1128/jb.176.7.2100-2104.1994>

88. Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16040–16046. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16040>
89. Lehmann, M., Degen, S., Hohmann, H. P., Wyss, M., Bacher, A., and Schramek, N. (2009). Biosynthesis of riboflavin. *FEBS Journal*, 276(15), 4119–4129. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07118.x>
90. Lim, S. H., Choi, J. S., and Park, E. Y. (2001). Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: an overview. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6, 75–88.
91. Lin, J. W., Chao, Y. F., and Weng, S. F. (2001). Riboflavin Synthesis Genes *ribE*, *ribB*, *ribH*, *ribA* Reside in the lux Operon of *Photobacterium leiognathi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(3), 587–595. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5013>
92. Liu, Y., Li, P., Fan, L., and Wu, M. (2018). The nuclear transportation routes of membrane-bound transcription factors. *Cell Communication and Signaling*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0224-3>
93. Logvinenko, E. M., Shavlovskii, G. M., Trach, V. M., and Sibirnyi, V. A. (1973). Role of flavins in regulating riboflavin synthetase synthesis in *Pichia guilliermondii* and *Candida utilis*. *Microbiology*, 42, 1008–1014.
94. Logvinenko, E. M., Shavlovskii, G. M., Zakalskii, A. E., and Zakhodylo, I. V. (1982). Effect of iron, actinomycin D and cycloheximide on the GTP-cyclohydrolase synthesis in flavinogenic yeasts. *Biochimia*, 7(1), 28–33.
95. Logvinenko, E. M., Shavlovsky, G. M., and Tsarenko, N. Y. U. (1984). The role of iron in regulation of 6'7'-dimethyl-8-ribityllumazine synthase synthesis in flavinogenic yeasts. *Biochimia*, 49(1), 45–50.
96. Lowry, O., Rosebrough, N., and Farr, A. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, 265–275.

97. Ludwig, H. C., Lottspeich, F., Henschen, A., Ladenstein, R., and Bacher, A. (1987). Heavy riboflavin synthase of *Bacillus subtilis*. Primary structure of the b subunit. *J. Biol. Chem*, 262, 1016–1021.
98. Mack, M., van Loon, A. P. G. M., and Hohmann, H. P. (1998). Regulation of Riboflavin Biosynthesis in *Bacillus subtilis* Is Affected by the Activity of the Flavokinase/Flavin Adenine Dinucleotide Synthetase Encoded by *ribC*. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 950–955. <https://doi.org/10.1128/jb.180.4.950-955.1998>
99. Mao, Q., Conseil, G., Gupta, A., Cole, S. P., and Unadkat, J. D. (2004). Functional expression of the human breast cancer resistance protein in *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(3), 730–737. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.012>
100. Marx, H., Mattanovich, D., and Sauer, M. (2008). Overexpression of the riboflavin biosynthetic pathway in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-23>
101. Masi, A., Mach, R. L., and Mach-Aigner, A. R. (2021). The pentose phosphate pathway in industrially relevant fungi: crucial insights for bioprocessing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(10), 4017–4031. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11314-x>
102. Mauersberger, S., Wang, H. J., Gaillardin, C., Barth, G., and Nicaud, J. M. (2001). Insertional Mutagenesis in the *n* -Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica*: Generation of Tagged Mutations in Genes Involved in Hydrophobic Substrate Utilization. *Journal of Bacteriology*, 183(17), 5102–5109. <https://doi.org/10.1128/jb.183.17.5102-5109.2001>
103. Mazur-Bialy, A. I., Buchala, B., and Plytycz, B. (2013). Riboflavin deprivation inhibits macrophage viability and activity – a study on the RAW 264.7 cell line. *British Journal of Nutrition*, 110(3), 509–514. <https://doi.org/10.1017/s0007114512005351>

104. Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 663–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.003311>
105. Milgrom, E., Diab, H., Middleton, F., and Kane, P. M. (2007). Loss of Vacuolar Proton-translocating ATPase Activity in Yeast Results in Chronic Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7125–7136. <https://doi.org/10.1074/jbc.m608293200>
106. Millerioux, Y., Clastre, M., Simkin, A. J., Courdavault, V., Marais, E., Sibirny, A. A., Noël, T., Crèche, J., Giglioli-Guivarc'h, N., and Papon, N. (2011). Drug-resistant cassettes for the efficient transformation of *Candida guilliermondii* wild-type strains. *FEMS Yeast Research*, 11(6), 457–463. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00731.x>
107. Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., Perumov, D. A., and Nudler, E. (2002). Sensing Small Molecules by Nascent RNA. *Cell*, 111(5), 747–756. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01134-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01134-0)
108. Mironov, V. N., Kraev, A. S., Chernov, B. K., Ul'yanov, A. V., Golova, Y. B., Pozmogova, G. E., Simonova, M. L., Gordeev, V. K., Stepanov, A. I., and Skryabin, K. G. (1989). Genes of riboflavin biosynthesis of *Bacillus subtilis* – complete primary structure and model of organization. *Dokl. Biochem*, 305, 79–83. [Article in Russian]
109. Mironov, V. N., Kraev, A. S., Chikindas, M. L., Chernov, B. K., Stepanov, A. I., and Skryabin, K. G. (1994). Functional organization of the riboflavin biosynthesis operon from *Bacillus subtilis* SHgw. *Molecular and General Genetics MGG*, 242(2), 201–208. <https://doi.org/10.1007/bf00391014>
110. Mironov, V. N., Perumov, D. A., Kraev, A. S., Stepanov, A. I., and Skriabin, K. G. (1990). Unusual structure of the regulatory region of the riboflavin biosynthesis operon in *Bacillus subtilis*. *Mol. Biol.*, 24(1), 256–261.
111. Morgunova, E., Meining, W., Illarionov, B., Haase, I., Jin, G., Bacher, A., Cushman, M., Fischer, M., and Ladenstein, R. (2005). Crystal Structure of

Lumazine Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* as a Target for Rational Drug Design: Binding Mode of a New Class of Purinetrione Inhibitors,. *Biochemistry*, 44(8), 2746–2758. <https://doi.org/10.1021/bi047848a>

112. Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L., and Breaker, R. R. (2002). Genetic Control by a Metabolite Binding mRNA. *Chemistry andamp; Biology*, 9(9), 1043–1049. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(02\)00224-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(02)00224-7)

113. Neidhardt, F. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. In R. Curtiss (Ed.), *J. Bacteriol* (2nd ed., Vol. 1, pp. 145–157). ASM Press.

114. Nelson, N. (1988). Structure, Function, and Evolution of Proton-ATPases. *Plant Physiology*, 86(1), 1–3. <https://doi.org/10.1104/pp.86.1.1>

115. Nelson, N. (1989). Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H⁺-ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21(5), 553–571. <https://doi.org/10.1007/bf00808113>

116. Neuberger, G., and Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 139(3), 1111–1116. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(86\)80292-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(86)80292-3)

117. Nguyen, H. V., Gaillardin, C., and Neuvéglise, C. (2009). Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flareri* (*D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*. *FEMS Yeast Research*, 9(4), 641–662. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00510.x>

118. Perkins, J. B., Pero, J. G., and Sloma, A. (1991). *Riboflavin-overproducing strains of bacteria* (EP0405370B1). European Patent Office. <https://patents.google.com/patent/EP0405370B1/en>

119. Peyru, G., and Fraenkel, D. G. (1968). Genetic Mapping of Loci for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, Gluconate-6-Phosphate Dehydrogenase, and

Gluconate-6-Phosphate Dehydrase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 95(4), 1272–1278. <https://doi.org/10.1128/jb.95.4.1272-1278.1968>

120. Poništ, J., Dubšíková, V., Schwarz, M., and Samešová, D. (2022). Methods of processing whey waste from dairies. A review. *Environment Protection Engineering*, 47(1). <https://doi.org/10.37190/epe210405>

121. Powers, H. J. (2003). Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1352–1360. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1352>

122. Prazeres, A. R., Rivas, J., Almeida, M. A., Patanita, M., Dôres, J., and Carvalho, F. (2016). Agricultural reuse of cheese whey wastewater treated by NaOH precipitation for tomato production under several saline conditions and sludge management. *Agricultural Water Management*, 167, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.12.025>

123. Revuelta, J. L., Buey, R. M., Ledesma-Amaro, R., and Vandamme, E. J. (2016). Microbial biotechnology for the synthesis of (pro)vitamins, biopigments and antioxidants: challenges and opportunities. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 564–567. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12379>

124. Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Lüttgen, H., Gerstenschläger, I., and Bacher, A. (1997). Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 179(6), 2022–2028. <https://doi.org/10.1128/jb.179.6.2022-2028.1997>

125. Sacerdot, C., Casaregola, S., Lafontaine, I., Tekai, F., Dujon, B., and Ozier-Kalogeropoulos, O. (2008). Promiscuous DNA in the nuclear genomes of hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, 8(6), 846–857. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00409.x>

126. Saliola, M., Tramonti, A., Lanini, C., Cialfi, S., de Biase, D., and Falcone, C. (2012). Intracellular NADPH Levels Affect the Oligomeric State of the Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. *Eukaryotic Cell*, 11(12), 1503–1511. <https://doi.org/10.1128/ec.00211-12>

127. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory.
128. Sandoval, F. J., and Roje, S. (2005). An FMN Hydrolase Is Fused to a Riboflavin Kinase Homolog in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38337–38345. <https://doi.org/10.1074/jbc.m500350200>
129. Sandoval, F. J., Zhang, Y., and Roje, S. (2008). Flavin Nucleotide Metabolism in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30890–30900. <https://doi.org/10.1074/jbc.m803416200>
130. Santos, M. A., García-Ramírez, J. J., and Revuelta, J. L. (1995). Riboflavin Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(1), 437–444. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.437>
131. Santos, R., Buisson, N., Knight, S. A. B., Dancis, A., Camadro, J. M., and Lesuisse, E. (2004). *Candida albicans* lacking the frataxin homologue: a relevant yeast model for studying the role of frataxin. *Molecular Microbiology*, 54(2), 507–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04281.x>
132. Schott, K., Kellermann, J., Lottspeich, F., and Bacher, A. (1990). Riboflavinsynthases of *Bacillus subtilis*. Purification and amino acid sequence of the a subunit. *J. Biol. Chem*, 265, 4202–4209.
133. Schwechheimer, S. K., Park, E. Y., Revuelta, J. L., Becker, J., and Wittmann, C. (2016). Biotechnology of riboflavin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2107–2119. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7256-z>
134. Shavlovskii, G. M., Babiak, L. I. A., Sibirnyi, A. A., and Logvinenko, E. M. (1985). Genetic control of riboflavin biosynthesis in *Pichia guilliermondii* yeasts. The detection of a new regulator gene *RIB81*. *Genetika*, 21, 368–374. [Article in Russian]
135. Shavlovskii, G. M., Fedorovich, D. V., and Babiak, L. Y. (1993). Effects of rib81 mutation on riboflavin biosynthesis and iron transport in the yeast *Pichia guilliermondii*. *Mikrobiologiya*, 62, 897–904. [Article in Russian]
136. Shavlovskii, G. M., Fedorovich, D. V., Kutsiaba, V. I., Babiak, L. Y., and Stenchuk, N. N. (1992). Involvement of gene *RIB80* in regulation of riboflavin

biosynthesis and iron transport in *Pichia guilliermondii*. *Genetika*, 28, 25–32. [Article in Russian]

137. Shavlovskii, G. M., Fedorovich, D. V., Logvinenko, E. M., and Koltun, L. V. (1985). Isolation and characterization of the flavinogenic strains of *Pichia guilliermondii* bearing regulatory mutation *rib80* (*ribR*). *Mikrobiologiya*, 54, 919–925. [Article in Russian]

138. Shavlovskii, G. M., Koltun, L. V., and Kashchenko, V. E. (1978). Regulation of the activity of GTP-cyclohydrolase, the enzyme of the first step of flavinogenesis in yeasts. *Biochimia*, 4(11), 2074–2081. [Article in Russian]

139. Shavlovskii, G. M., Koltun, L. V., Kshanovskaya, B. V., Logvinenko, E. M., and Stenchuk, N. N. (1989). Regulation of Biosynthesis of Riboflavin by Elements of Positive Control in *Pichia guilliermondii* Yeast. *Genetika*, 25, 250–258. [Article in Russian]

140. Shavlovskii, G. M., and Laska, D. V. (1973). Investigation of flavinogenesis of *Pichia guilliermondii* mutants with impaired heme synthesis. *Microbiology*, 42(4), 682–687. [Article in Russian]

141. Shavlovskii, G. M., and Logvinenko, E. M. (1988). Supersynthesis of flavins in microorganisms and its molecular mechanism (review of the literature). *Prikl Biokhim Mikrobiol.*, 24(4), 435–447. [Article in Russian]

142. Shavlovskii, G. M., Sibirnyi, A. A., Kshanovskaia, B. V., Koltun, L. V., and Logvinenko, E. M. (1979). Genetic classification of riboflavin-dependent mutants of *Pichia guilliermondii* yeasts. *Genetika*, 15, 1561–1568. [Article in Russian]

143. Shavlovsky, G. M., Logvinenko, E. M., Benndorf, R., Koltun, L. V., Kashchenko, V. E., Zakalsky, A. E., Schlee, D., and Reinbothe, H. (1980). First reaction of riboflavin biosynthesis – Catalysis by a guanosine triphosphate cyclohydrolase from yeast. *Archives of Microbiology*, 124(2–3), 255–259. <https://doi.org/10.1007/bf00427735>

144. Shavlovsky, G. M., Logvinenko, E. M., Schlee, D., and Koltun, L. V. (1976). Regulation of 6-hydroxy-2,4,5-triaminopyrimidine synthesis by riboflavin-

deficient mutants of *Pichia guilliermondii*. *Biochem. et Biophys. Acta*, 428(2), 611–618.

145. Sibirny, A. A. (1996). *Pichia guilliermondii*. In K. Wolf (Ed.), *Nonconventional Yeasts in biotechnology* (pp. 255–272). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_7

146. Sibirny, A. A., and Boretsky, Y. R. (2009). *Pichia guilliermondii*. In T. Satyanarayana and G. Kunze (Eds.), *Yeast biotechnology: Diversity and applications* (pp. 113–134). Springer Science.

147. Sibirny, A. A., and Voronovsky, A. Y. (2009). *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*). In K. Satyanarayana and G. Kunze (Eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 85–111). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_5

148. Siddiqi, R., and Khan, M. A. (1982). Vitamin and nitrogen base requirements for *Listeria monocytogenes* and haemolysin production. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, 253, 225–235.

149. Solovieva, I. M., Kreneva, R. A., Leak, D. J., and Perumov, D. A. (1999). The *ribR* gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Microbiology*, 145(1), 67–73. doi: 10.1099/13500872-145-1-67.

150. Stahmann, K. P., Arst, H. N., Althofer, H., Revuelta, J. L., Monschau, N., Schlupen, C., Gatgens, C., Wiesenburg, A., and Schlosser, T. (2001). Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environmental Microbiology*, 3(9), 545–550. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00225.x>

151. Stahmann, K. P., Revuelta, J. L., and Seulberger, H. (2000). Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 509–516. <https://doi.org/10.1007/s002530051649>

152. Stanford, D. R., Whitney, M. L., Hurto, R. L., Eisaman, D. M., Shen, W. C., and Hopper, A. K. (2004). Division of Labor Among the Yeast Sol Proteins

Implicated in tRNA Nuclear Export and Carbohydrate Metabolism. *Genetics*, 168(1), 117–127. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.030452>

153. Stenchuk, N. N., Protchenko, O. V., Fedorovich, D. V., and Shavlovskii, G. M. (1991). The mutants of *Pichia guilliermondii* with enhanced ability to reduce iron ions and riboflavin. *Genetika*, 27, 561–564. [Article in Russian]

154. Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., and Ralser, M. (2016). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>

155. Suwannasom, N., Kao, I., Pruß, A., Georgieva, R., and Bäumler, H. (2020). Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 950. <https://doi.org/10.3390/ijms21030950>

156. Tanner, F. W., Vojnovich, C., and van Lanen, J. M. (1945). Riboflavin Production by *Candida* Species. *Science*, 101(2616), 180–181. <https://doi.org/10.1126/science.101.2616.180>

157. Terrade, N., and Mira, R. (2009). Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int. J. Food Microbiol*, 133, 8–13.

158. Thomas, D., Cherest, H., and Surdin-Kerjan, Y. (1991). Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur. *The EMBO Journal*, 10(3), 547–553. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07981.x>

159. Toyosawa, T., Suzuki, M., Kodama, K., and Araki, S. (2004a). Effects of intravenous infusion of highly purified vitamin B₂ on lipopolysaccharide-induced shock and bacterial infection in mice. *European Journal of Pharmacology*, 492(2–3), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.04.004>

160. Toyosawa, T., Suzuki, M., Kodama, K., and Araki, S. (2004b). Potentiation by amino acid of the therapeutic effect of highly purified vitamin B₂ in mice with lipopolysaccharide-induced shock. *European Journal of Pharmacology*, 493(1–3), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.04.019>
161. Trach, V., Logvinenko, E., Schlee, D., Reinbothe, H., and Shavlovsky, G. (1982). Einfluß von Transkriptionsinhibitoren auf die Derepression der Riboflavinsynthase in der Hefe *Torulopsis candida*. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, 177(7), 585–592. [https://doi.org/10.1016/s0015-3796\(82\)80052-8](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(82)80052-8)
162. Tsyrlunyk, A., Fedorovych, D., Sobchuk, S., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2021). Lactose Inducible Expression of Transcription Factor Gene *SEF1* Increases Riboflavin Production in the Yeast *Candida famata*. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 83(5), 3–10. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.05.003>
163. Tsyrlunyk, A. O., Andreieva, Y. A., Ruchala, J., Fayura, L. R., Dmytruk, K. V., Fedorovych, D. V., and Sibirny, A. A. (2020). 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*, 37(9–10), 467–473. <https://doi.org/10.1002/yea.3470>
164. van Herwaarden, A. E., Jonker, J. W., Wagenaar, E., Brinkhuis, R. F., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., and Schinkel, A. H. (2003). The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridin. *Cancer Res*, 63, 6447–6452.
165. Vandamme, E. J. (1992). Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *Journal of Chemical Technology andamp; Biotechnology*, 53(4), 313–327. <https://doi.org/10.1002/jctb.280530402>
166. Vandamme, E. J., and Revuelta, J. L. (2016). *Vitamins, Biopigments, Antioxidants and Related Compounds: A Historical, Physiological and (Bio)technological Perspective*. Wiley-VCH Verlag GmbH KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527681754.CH1>

167. Vincze, T. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688–3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>
168. Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., and Gelfand, M. S. (2002). Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3141–3151. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf433>
169. Volk, R., and Bacher, A. (1990). Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(32), 19479–19485. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)45398-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)45398-1)
170. Voronovsky, A., Abbas, C., Fayura, L., Kshanovska, B., Dmytruk, K., Sybirna, K., and Sibirny, A. (2002). Development of a transformation system for the flavinogenic yeast. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 381–388. [https://doi.org/10.1016/s1567-1356\(02\)00112-5](https://doi.org/10.1016/s1567-1356(02)00112-5)
171. Voronovsky, A. Y., Abbas, C. A., Dmytruk, K. V., Ishchuk, O. P., Kshanovska, B. V., Sybirna, K. A., Gaillardin, C., and Sibirny, A. A. (2004). *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) DNA sequences containing genes involved in riboflavin synthesis. *Yeast*, 21(15), 1307–1316. <https://doi.org/10.1002/yea.1182>
172. Wagner, J. M., Liu, L., Yuan, S. F., Venkataraman, M. V., Abate, A. R., and Alper, H. S. (2018). A comparative analysis of single cell and droplet-based FACS for improving production phenotypes: Riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 47, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.015>
173. Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Ju, L., Chi, Z., and Guo, N. (2008). Isolation and characterization of *Candida membranifaciens* subsp. flavinogenic W14-3, a novel riboflavin-producing marine yeast. *Microbiological Research*, 163(3), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.12.001>

174. Wang, Z., Chen, T., Ma, X., Shen, Z., and Zhao, X. (2011). Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of *zwf* and *gnd* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*, 102(4), 3934–3940. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.120>
175. Wickerham, L. J., Flickinger, M. H., and Johnston, R. M. (1946). The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Arch. Biochem*, 9, 95–98.
176. Winestock, C. H., Aogaichi, T., and Plaut, G. (1963). The Substrate Specificity of Riboflavin Synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 238(8), 2866–2874. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)67910-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67910-4)
177. Winkler, W. C., Cohen-Chalamish, S., and Breaker, R. R. (2002). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15908–15913. <https://doi.org/10.1073/pnas.212628899>
178. Worst, D. J., M. Gerrits, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., and Kusters, J. G. (1998). *Helicobacter pylori* *ribBA* -Mediated Riboflavin Production Is Involved in Iron Acquisition. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1473–1479. <https://doi.org/10.1128/jb.180.6.1473-1479.1998>
179. Wu, M., Repetto, B., Glerum, D. M., and Tzagoloff, A. (1995). Cloning and characterization of FAD1, the structural gene for flavin adenine dinucleotide synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(1), 264–271. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.1.264>
180. Xue, Z., Sharpe, P. L., Hong, S. P., Yadav, N. S., Xie, D., Short, D. R., Damude, H. G., Rupert, R. A., Seip, J. E., Wang, J., Pollak, D. W., Bostick, M. W., Bosak, M. D., Macool, D. J., Hollerbach, D. H., Zhang, H., Arcilla, D. M., Bledsoe, S. A., Croker, K., Zhu, Q. (2013). Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nature Biotechnology*, 31(8), 734–740. <https://doi.org/10.1038/nbt.2622>
181. Yagi, K., Matsuoka, Y., Kuyama, S., and Tada, M. (1956). Preparation of flavin adenine dinucleotide from *Eremothecium ashbyii*. *J. Biochem.*, 43, 93–100.

182. You, J., Pan, X., Yang, C., Du, Y., Osire, T., Yang, T., Zhang, X., Xu, M., Xu, G., and Rao, Z. (2021). Microbial production of riboflavin: Biotechnological advances and perspectives. *Metabolic Engineering*, 68, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.08.009>
183. Zu Berstenhorst, S., Hohmann, H. P., and Stahmann, K. P. (2009). Vitamins and Vitamin-like Compounds: Microbial Production. *Encyclopedia of Microbiology*, 549–561. <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00161-9>
184. Zylberman, V., Klinke, S., Haase, I., Bacher, A., Fischer, M., and Goldbaum, F. A. (2006). Evolution of Vitamin B₂ Biosynthesis: 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine Synthases of *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, 188(17), 6135–6142. <https://doi.org/10.1128/jb.00207-06>
185. *Basic Local Alignment Search Tool*. (n.d.). National Center for Biotechnology Information. Retrieved April 21, 2020, from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
186. *BLAST - Debaryomyces hansenii CBS 767*. (n.d.). *Debaryomyces hansenii* CBS 767. Retrieved January 19, 2022, from <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Debha1/Debha1.home.html>
187. *DNA Manipulation*. (n.d.). The Sequence Manipulation Suite. Retrieved April 10, 2022, from <http://www.bioinformatics.org/sms/>
188. *Multiple Sequence Alignment*. (n.d.). EMBL's European Bioinformatics Institute. Retrieved October 18, 2019, from <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
189. *Multiple sequence alignment by Florence Corpet*. (2000). Multiple Sequence Alignment. Retrieved September 10, 2019, from <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
190. *NEBcutter V2.0*. (n.d.). New England Biolabs. Retrieved February 8, 2022, from <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
191. *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*. (2007). Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. Retrieved April 4, 2022, from <http://biotools.nubic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

192. *Riboflavin Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, And Forecasts (2022 - 2027)*. (2022). Mordor Intelligence. Retrieved May 25, 2022, from <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/riboflavin-market>
193. *S. cerevisiae NCBI-BLAST Search*. (n.d.). *Saccharomyces* Genome Database | SGD. Retrieved November 30, 2021, from <https://www.yeastgenome.org/>

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

За темою дисертації опубліковано 10 наукових робіт, серед яких три статті у міжнародних виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus та Web of Science Core Collection, а також сім тез доповідей у матеріалах конференцій, наукових з'їздів та конгресів.

1. **Andreieva, Y.**, Petrovska, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020). Role of the regulatory genes *SEF1*, *VMA1* and *SFU1* in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*, 37(9–10), 497–504. <https://doi.org/10.1002/yea.3503>. Q2. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, провела аналіз та узагальнення отриманих даних, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

2. Tsyurulnyk, A. O., **Andreieva, Y. A.**, Ruchala, J., Fayura, L. R., Dmytruk, K. V., Fedorovych, D. V., and Sibirny, A. A. (2020). 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*, 37(9–10), 467–473. <https://doi.org/10.1002/yea.3470>. Q2. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, провела аналіз та узагальнення отриманих даних, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

3. **Andreieva, Y.**, Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020). *SEF1* and *VMA1* Genes Regulate Riboflavin Biosynthesis in the Flavinogenic Yeast *Candida famata*. *Cytology and Genetics*, 54(5), 379–385. <https://doi.org/10.3103/s0095452720050023>. Q4. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, провела аналіз та узагальнення отриманих даних, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

4. **Andreieva, Y.**, Liu, W., Dmytruk, K., Sibirny, A. Evaluation of the effect of overexpressed genes *ZWF1* and *GND1* on riboflavin synthesis by flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flarerii*) // 8th International Conference

“Human – Nutrition – Environment”, October 13-14, Rzeszow, Poland. – 2021. – P. 66.

5. **Andreieva Y.**, Dmytruk K., Sibirny A. Evaluation of the impact of *VMA1* gene-deletion on the riboflavin production in the flavinogenic yeast *Candida famata* // 6 th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, June 18-21, Yaremche, Ukraine, Book of Abstracts. – 2019. – P. 83.

6. Sibirny, A., Fedorovych, D., Fayura, L., Tsyurulnyk, A., **Andreieva, Y.**, Petrovska, Y., Ruchala, J., Dmytruk, K. Construction of the Advanced Producer of Riboflavin on Whey and Lignocellulose Hydrolyzates in the Flavinogenic Yeast *Candida famata* // ISSY 35. The 35th International Specialized Symposium on Yeasts, 21- 25 October, Antalya, Turkey, Book of Abstracts. – 2019. – P. 54.

7. **Andreieva, Y.**, Dmytruk, K., Sibirny, A. Evaluation of the impact of *VMA1* gene-deletion on the riboflavin production in the flavinogenic yeast *Candida famata*. XV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of biology”; 2019 April 9-11; Lviv, Ukraine. – P. 80.

8. **Andreieva, Y.** Investigation of possible *VMA1* gene-deletion role in the riboflavin production in the flavinogenic yeast *Candida famata* // Conference of young scientists of the Institute of Cell Biology, May 29, Lviv, Ukraine, Book of Abstracts. – 2019. – P. 7.

9. Dmytruk, K., Lyzak, O., **Andreieva, Y.**, Petrovska, Y., Fedorovych, D., Sibirny A. Riboflavin oversynthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* // Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. 15-18 May, 2018. Rzeszow, Poland. – P. 106.

10. **Andreieva, Y.**, Lyzak, O., Dmytruk, K., Sibirny A. Analysis of *Candida famata SEF1* gene expression under control of *SEF1* promoters from other yeast species // International Conference «Advances in Microbiology and Biotechnology», October 29-31, Lviv, Ukraine, Book of Abstracts. – 2018. – P. 59.

Штами мікроорганізмів використаних у роботі

Назва штаму	Опис	Посилання
1	2	3
<i>C. famata</i>		
VKM Y-9	<i>wild type</i>	Всеросійська колекція мікроорганізмів, Пущино, РФ
L20105	<i>leu2</i> –	(Voronovsky et al., 2002)
<i>vmal1Δ</i>	<i>vmal1</i> –. Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.1
<i>sef1Δ</i>	<i>sef1</i> –	Розділ 3.2.1
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_ Cf	<i>sef1Δ</i> із експресією гена <i>SEF1</i> <i>C. famata</i> під контролем промотора з <i>C. famata</i> . Резистентний до норзеотрицину	Розділ 3.2.1
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_ Ca	<i>sef1Δ</i> із експресією гена <i>SEF1</i> <i>C. famata</i> під контролем промотора з <i>C. albicans</i> . Резистентний до норзеотрицину	Розділ 3.2.1
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_ Ct	<i>sef1Δ</i> із експресією гена <i>SEF1</i> <i>C. famata</i> під контролем промотора з <i>C. tropicalis</i> . Резистентний до норзеотрицину	Розділ 3.2.1
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_ Ss	<i>sef1Δ</i> із експресією гена <i>SEF1</i> <i>C. famata</i> під контролем промотора з <i>S. stipitis</i> . Резистентний до норзеотрицину	Розділ 3.2.1

1	2	3
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_ Sc	<i>sef1Δ</i> із експресією гена <i>SEF1</i> <i>C. famata</i> під контролем промотора з <i>S. cerevisiae</i> . Резистентний до норзеотрицину	Розділ 3.2.1
<i>sef1Δ</i> /pNTC/SEF1pr_ Cf/ORF_Ss	<i>sef1Δ</i> із експресією гена <i>SEF1</i> <i>S. stipitis</i> під контролем промотора з <i>C. famata</i> . Резистентний до норзеотрицину	Розділ 3.2.2
AF-4	Виділений за допомогою класичного мутагенезу та селекції	(Dmytruk et al., 2011)
BRP	AF-4/SEF1/RIB1/RIB7	(Dmytruk et al., 2014)
L20105/ZWF1	L20105 з експресією <i>ZWF1</i> під контролем промотора <i>C. famata</i> <i>TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1
AF-4/ZWF1	AF-4 з експресією <i>ZWF1</i> під контролем промотора <i>C. famata</i> <i>TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1
BRP/ZWF1	BRP з експресією <i>ZWF1</i> під контролем промотора <i>C. famata</i> <i>TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1
L20105/GND1	L20105 з експресією <i>GND1</i> під контролем промотора <i>C. famata</i> <i>TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1
AF-4/GND1	AF4 з експресією <i>GND1</i> під контролем промотора <i>C. famata</i> <i>TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1
BRP/GND1	BRP з експресією <i>GND1</i> під контролем промотора <i>C. famata</i> <i>TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1

1	2	3
L20105/ZWF1/GND1	L20105 з експресією <i>ZWF1</i> та <i>GND1</i> під контролем промотора <i>C. famata TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1
AF-4/ZWF1/GND1	AF4 з експресією <i>ZWF1</i> та <i>GND1</i> під контролем промотора <i>C. famata TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1
BRP/ZWF1/GND1	BRP з експресією <i>ZWF1</i> та <i>GND1</i> під контролем промотора <i>C. famata TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.1
L20105/SOL3	L20105 з експресією <i>SOL3</i> під контролем промотора <i>C. famata TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.3
AF-4/SOL3	AF-4 з експресією <i>SOL3</i> під контролем промотора <i>C. famata TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.3
BRP/SOL3	BRP з експресією <i>SOL3</i> під контролем промотора <i>C. famata TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.3.3
BRP/RFE1	BRP з експресією <i>RFE1 D. hansenii</i> під контролем промотора <i>D. hansenii TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	(Tsyurulnyk et al, 2020)
L20105/RFE1-GFP	L20105 з експресією міченого GFP <i>RFE1</i> гена <i>D. hansenii</i> під контролем промотора <i>D. hansenii TEF1</i> . Резистентний до флеоміцину	Розділ 3.4.

1	2	3
<i>C. albicans</i>		
SC5314	–	(Gillum et al., 1984)
<i>C. tropicalis</i>		
MYA-3404	–	(Butler et al., 2009)
<i>S. stipitis</i>		
CBS6054	–	American Type Culture Collection
<i>S. cerevisiae</i>		
S288C	–	(Fisk et al., 2006)
<i>D. hansenii</i>		
CBS767	–	(Voronovsky et al., 2002)
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K [–] , m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA</i> – <i>argF</i>)U169	(Neidhardt, 1996)

Перелік праймерів, використаних у дисертаційній роботі

Назва	Нуклеотидна послідовність праймера 5' – 3'
1	2
Ko392	CGCGAGCTCATGGAGAAGTCAAGAATAAAATC
Ko394	CGCGGATCCTTAGTTTTTCAGGAATCATGTTTG
Ko478	AAACTGCAGGTTCAACAAATGGAGGAAACAAG
Ko479	AAACTGCAGTGCGTTCTCCAATAAATAATCCG
Ko480	CGCGTCGACCTTACCTACAAATTTCCGTTGTC
Ko481	CGCGGATCCTCGAACCAACCTAAGAAATCATC
Ko482	TGATGTAATTGTTGGGATTCC
Ko483	CAATACCTTCTTGAACCATTTC
Ko873	GGTATTGATGCCCCAGCATTATC
Ko874	CAGGATCAGAGAAATCACCACC
Ko1052	CGCGGATCCATGTCAGTAGAACCATTTGGTAAACAC
Ko1053	GCACTGCAGTTACATTTTACCCTTGACGTTTGGTG
Ko1054	GCACTGCAGGCGGCCGCATGTCTGCTCCAACGTATGTATTCTT C
Ko1055	GCACTGCAGCTAAGCATCGTAAGTAGAGGCAGAAAC
Ko1056	CGGGGTACCAAATTGACTGGTCTGAAATAATAG
Ko1057	CGGGGTACCGATTATTGACTCGAGATGTTGCG
Ko1058	CACGAAACAATCCAAATAAAGCTG
Kp1059	GTTCAATAAAAGCATCAACTGG
Ko1203	CGCGGATCCATGTCAGCTAAAGTATATTCTCACG
Ko1204	AAACTGCAG TTAGTATTTCTGAAGAGATCACATTG
Ko1205	TGCGCTGGAAACATCATCATG

1	2
Ko1043	GAAAGGTCGACTCTAAAGGTGAAGAATTATTCCTGG
Ko1044	AGCCTGCAGTCAATTGAACAGAACCATCTTCAATGTTG
Ko1045	TTCAATTGACTGCAGGCTCCTTAAACGTATT
Ko1046	CTTTAGAGTCGACCTTTCTCAACTTTAAACCAACGTAAC
OL20	CGGGATCCATGGAGAAGTCTAGAATAAAATCAATACTT
OL23	AGGTTGAAGTGGGAATTGCATC
OL35	CCCGAGCTCTCAATACGACTTCACTCCTGG
OL36	CAGATTTTGAGTCTGTAAAGCCATATGGAAATAGTGCTTGCAA ATTCC
OL37	GGAATTTGCAAGCACTATTTCCATATGGCTTTACAGACTCAAA ATCTG
OL38	CCCC GTCGAC AAAATGAAGCTAACTTGGCACCTA
OL40	CCCTATTTACTGTTACCATCC
OL41	GTTGCCGCAATTGAAGTAGA
OL86	AAAGCGGCCGCATATGAGTCTTATATATATC
OL87	AAGCGGCCGCATATGTCACATAACCACAAG
OL143	AAAGAGCTCGAGCGTAATAATTGTCTACTGAACATC
OL144	AAAGGGCCCTTG TAGATTCTATCATGTCGCTTTACAGAAC
OL145	AAAGGATCCTTGAAAGATAACTTTTGCAACTAACTTTCCTATC
OL146	AAAGGGCCCAA ACTAAAATTAGTGACTCATTTACTTGTTTTTG
OL147	AAAGGATCCTTTTCTATAGAAACAAATGTTGAGGTTCTATG
OL148	AAAGGGCCCAGAAACCAATTGGTGGGAATATTATTG
OL149	AAAGGATCCTTGGTCAATAGTTAGGATGTACAAATAAAAC
OL152	AAGGGCCCATGGAAATAAAATTATAAAAGCGACTTCG
OL153	AAAGGATCCGTTGTAACAGTGTGGAAGTGGAG
OL154	AAAGGGCCCATGGACCCTTCCTAAGCAGGC

1	2
OL155	AAAGGATCCGACGAGAATGCGTATACGCAGAG
YL2	ctgtggccggtttgcttcgaTATGGCTGGAAGTGAAGCTCAT
YL3	atgagctcagttccagecataTCGAAGCAAACCGGCCACAG
YL4	cgactggtgctgaagcgcTG TAGATGGAAGTATAGGAGCATTG
YL5	cctatacttccatctacaGCGCTTCAGCACCAAGTCGTT
YL8	TTTCGTCAGAGATGATGAATTAG
YL9	TGCGCTGATAAGAAAGGTCTT
YL10	ACCCATTCTTCAACGATGCTA
YL11	GCCCACACTTTCCAAGTG
YL20	cgGGCGCGCCATGGAGAAGTCCAAGATCAAG
YL21	aaaGCTAGCTTATTGATCGGAACGCATGTTCA
TsFw1	CCC AAGCTT AAA TTG ACT GGT CTG AAA TAA TAG
TsRev1	CGC GGATCC TTT GCT TAA TGT ATA ATA ATA GTA