

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЦИРУЛЬНИК АНДРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 579.017.7: 579.258

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.07 – Мікробіологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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


_____ А. О. Цирульник

Науковий керівник: Сибірний Андрій Андрійович, доктор біологічних наук,
професор, академік НАН України

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертаційна робота присвячується використанню методів метаболічної інженерії для підвищення продукції флавінів штамами дріжджів *Candida famata* шляхом надекспресії модифікованих регуляторних та структурних генів флавіногенезу.

Рибофлавін (вітамін В₂, РФ) є важливим та широко поширеним у живій природі вітаміном. Його синтезують переважна більшість мікроорганізмів та рослин. Проте, людина та тварини нездатні до його ендogenous біосинтезу, а отже, отримують цей вітамін лише з продуктами харчування. Найбільш активними продуцентами РФ вважаються деякі види бактерій, міцеліальних грибів та дріжджів, що одержали назву – флавіногенні. Інші мікроорганізми та рослини синтезують низькі кількості цього вітаміну, достатні для забезпечення власних потреб. Відомі також ауксотрофи за РФ серед мікроорганізмів. До таких відносять деякі види молочнокислих бактерій, спірохетів, мікоплазм, рикетсій, а також *Corynebacterium pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* та ін. (Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006; Abbas and Sibirny, 2011).

РФ, потрапляючи у клітину фосфорилується з утворенням його біологічно активної форми флавінмононуклеотиду (ФМН), який у свою чергу приєднує залишок аденілового нуклеотиду і перетворюється у флавінаденінмононуклеотид (ФАД) (Bacher, 1991; Efimov et al., 1998; Mack et

al., 1998; Abbas and Sibirny, 2011). Саме ці дві флавінові сполуки, зв'язуючись як кофактори з багатьма флавін-залежними білками та регуляторними факторами забезпечують регуляцію центральних біологічних процесів. Основною регуляторною властивістю флавінів є здатність до переносу електронів та протонів, що робить їх невід'ємною ланкою окисно-відновних ланцюгів у мітохондріях та окисно-відновних реакцій в цілому (Beztsinna et al., 2016; Suwannasom et al., 2020). Також відома ціла низка інших важливих процесів у яких беруть участь ці сполуки, серед них: формування нервової тканини плода, функціонування та захист слизових оболонок та шкіри. Флавіни забезпечують функціонування зорової та нервової систем. Описано важливу роль цих сполук у забезпеченні формування ефективної фагоцитарної імунної відповіді та протиракової активності імунітету в цілому (Araki et al., 1995, Mazur-Bialy et al., 2013). Серед перших ознак дефіциту РФ є запалення слизових поверхонь ока - кон'юнктивіти, підвищена світлочутливість. Також спостерігається сухість та пошкодження шкіри, виникнення хейлітів, глоситів, катаракти, мігрені. У більш складних випадках відбувається порушення функціонування нервової та імунної систем організму (Powers, 2003; Toyosawa et al., 2004a; Toyosawa et al., 2004b). Дефіцит РФ у людей виникає рідко, в основному при метаболічних порушеннях. У сфері тваринництва, нестача цього вітаміну є більш поширеною. Внесення РФ як кормової добавки підвищує показники надою молока у корів, знижує падіж молодняку худоби та суттєво підвищує яйценосність у курей (Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006).

На даний час, РФ виробляють у промислових масштабах шляхом мікробного синтезу. До найкращих промислових продуцентів відносять генетично модифіковані бактерії *Bacillus subtilis* та міцеліальні гриби *Ashbya gossypii* (Stahmann et al., 2000; Abbas and Sibirny, 2011). На їх основі налагоджено виробництво РФ компаніями BASF, DSM та Hubei Guangji Pharmaceutical. Станом на 2021 рік фінансова складова виробництва цього вітаміну становила близько 400 мільйонів американських доларів у кількостях

до 12 тис. тонн РФ на рік (*Riboflavin Market – Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022-2027)*, 2022). У минулому, дріжджовий надсинтетик *dep8 Candida famata* активно використовувався для отримання РФ фірмою ADM. Проте через низьку генетичну стабільність, його використання було зупинено (Abbas and Sibirny, 2011). Тому, одержання стабільних рекомбінантних штамів цього виду дріжджів є важливим та перспективним напрямком сучасної мікробіології.

До переваг використання дріжджів у порівнянні із бактеріями слід віднести їх стійкість до фагового зараження та лізису. Також, на відміну від міцеліальних грибів, дріжджі здатні до росту у простих рідких живильних середовищах та продукувати флавіни в експотенціальній фазі росту. Особливої уваги заслуговує здатність деяких видів дріжджів рости на дешевому побічному продукті молочного виробництва – молочній сироватці (МС). Природна утилізація МС характеризується високим споживанням кисню, швидким бактерійним зараженням та суттєвим забрудненням довкілля.

На даний час, сконструйовано стабільні дріжджові РФ-надсинтетики *C. famata*. До них належать штами AF-4, отриманий методом класичного мутагенезу, та додатково покращені шляхом генної інженерії - BRP та BRPI (Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2020). Проте рівень продукції РФ, все ще є недостатнім для налагодження рентабельного виробництва цього вітаміну на їх основі.

У даній роботі проведено покращення згаданих вище надсинтетиків РФ шляхом введення генів РФ-екскретази (*RFE1*) та регуляторного фактора *SEF1*. Так, введення гена *RFE1* привело до підвищення продукції РФ у 1,5 раза рекомбінантами BRP/RFE1 порівняно з реципієнтним штамом BRP. Також було сконструйовано рекомбінантні штами BRP/prLAC4-SEF1 на основі штаму BRP шляхом введення гена позитивної регуляції синтезу РФ *SEF1* під контролем промотора гена β -галактозидази - *LAC4*, який індукується лактозою. Надекспресія гена *SEF1* під контролем промотора *LAC4*, забезпечила 1,5 кратне

збільшення продукції РФ із використанням як живильного середовища МС. Аналіз флавіногенної активності дріжджових надсинтетиків РФ AF-4, BRP та BRP/RFE1 також виявив здатність до високого рівня синтезу цього флавіну при використанні МС. Експериментальним шляхом було встановлено, що активний ріст та флавіногенез дріжджів у МС можливий лише при внесенні додаткового джерела Нітрогену в вигляді сечовини, амоній сульфату та ін. Крім цього, ріст спостерігається лише при низьких концентраціях лактози (2-5%) у сироватці. Використання МС як живильного середовища для мікробного синтезу РФ значно знизить собівартість цього виробництва та забезпечить зменшення забруднення довкілля відходами молочної промисловості.

Заключною частиною роботи було одержання нового дріжджового продуцента бактерійної антибіотичної сполуки – амінорибофлавіну (АФ). До теперішнього часу не було створено продуцентів бактерійних антибіотиків на основі дріжджів – відносно філогенетично далекого виду мікроорганізмів. Більше цього, слід прийняти до уваги, що бактерії відносять до прокаріотичних організмів, тоді як дріжджі до еукаріотичних.

Відомо, що бактерії роду *Streptomyces davaonensis* та *Streptomyces cinnabarinus* здатні синтезувати антибіотик розеофлавін (РоФ) (Otani et al., 1974; Kasai et al., 1978; Matsui et al., 1979) який проявляє сильну протимікробну дію на низку патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів - *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Plasmodium falciparum* та ін. (Matsui et al., 1979; Jankowitsch et al., 2011; Hemasa et al., 2022). На жаль, завдяки своїм біологічним властивостям ця сполука є також токсичною і для клітин людини. Проте, метаболічний попередник РоФ – АФ проявляє цитотоксичну дію лише на мікроорганізми та може використовуватись у протиінфекційній терапії широкого спектра дії. Ця відмінність у проявах та відсутності цитотоксичної дії РоФ і АФ пояснюється нездатністю клітин ссавців транспортувати АФ через флавінові транспортні системи у клітину, а також відсутністю каталітичного

перетворення АФ у цитотоксичний аналог ФАД – АФАД, на відміну від РоФ (Pedrolli et al., 2011; Pedrolli et al., 2013).

Основною цінністю АФ є його вибіркова антибіотична дія проти цілого спектра штамів золотистого стафілокока (*S. aureus*) (Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017) які викликають небезпечні та поширені бактерійні інфекції при хірургічному втручанні та наявності відкритих ран. Ця проблема є особливо актуальною в Україні на час ведення активних бойових дій, за наявності великої кількості важкопоранених та необхідністю у багатьох випадках надавати першу невідкладну медичну допомогу в польових умовах. Тривалий час транспортування поранених із відкритими пошкодженнями шкірних покривів та відсутністю стерильних умов підвищує ризик зараження *S. aureus* у рази.

Крім цього, АФ проявляє антибактерійну дію проти метицилін-резистентних мутантних штамів MRSA (Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017), що характеризується високим рівнем летальності пацієнтів. Це відкриває великий терапевтичний потенціал цієї сполуки при лікуванні інфекцій викликаних MRSA.

Рівень продукції РоФ природніми бактеріями *S. dawaonensis* низький. Його метаболічний попередник АФ синтезується взагалі у слідових кількостях, тому ці мікроорганізми для промислового виробництва АФ не використовуються. На даний час, АФ одержують лише хімічним синтезом у невеликих кількостях.

Беручи до уваги, що АФ утворюється із ФМН, який у свою чергу синтезується із РФ, нами було заплановано створення продуцентів АФ на основі сконструйованих раніше у нашому відділі надсинтетиків ФМН FP (Flavinemononucleotide Producer) *C. famata* (Yatsyshyn et al., 2009).

Біосинтез АФ із ФМН у бактерій відбувається в декількох послідовних реакціях за участю двох ферментів – фосфатази та 8-диметил-8-амінорибофлавін-5'-фосфатсинтетази (фермент RosB). Фосфатазна активність у

клітинах мікроорганізмів зазвичай постійно присутня на достатньо високому рівні. Тому ми вирішили перенести ген *rosB* *S. davaonensis* який кодує згаданий вище бактерійний фермент RosB у штам дріжджів FP *C. famata*. Оскільки, кодонова система ДНК-зчитування дріжджів дещо інша у порівнянні із бактерійною, а саме: триплет кодон CUG дріжджів кодує серин, а не лейцин, як у бактерій (Voronovsky et al., 2004; Dmytruk and Sibirny, 2012), ця особливість була врахована при отриманні синтетичного гена *rosB*.

Аналіз флавіногенної активності одержаних рекомбінантних штамів які містять ген *rosB*, дозволив виявити нову фракцію флавінів. За коефіцієнтом затримання при хроматографії одержана фракція відповідала опублікованому для АФ значенню (R_f 0,10) (György and Pearson, 1967; Juri et al., 1987; Tyagi et al., 2009). Проведений мас-спектрометричний аналіз чітко підтвердив, що виявлена сполука є АФ. Продукція АФ у культуральному середовищі рекомбінантів FP/RosB *C. famata* сягала 5 мг/л. Синтез АФ у природі здійснюється лише прокаріотичними мікроорганізмами. Нами вперше отримано бактерійну сполуку - АФ яка продукується еукаріотичним мікроорганізмом - дріжджами *C. famata*.

Використання сконструйованого продуцента FP/RosB *C. famata* для подальшого удосконалення та підвищення рівня продукції АФ є перспективним напрямком досліджень, необхідним для розроблення технології та налагодження промислового мікробного синтезу цієї антибіотичної сполуки.

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

SUMMURY

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

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

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

Riboflavin (vitamin B₂, RF) is an important and widespread vitamin in living nature. It is synthesized by the vast majority of microorganisms and plants. However, humans and animals are incapable of its endogenous biosynthesis, and therefore receive it only with food products. The most active producers are some types of bacteria, mycelial fungi, and yeasts named as flavinogenic. Other microorganisms and plants synthesize low amounts of this vitamin sufficient to meet their own needs. RF auxotrophs are also known among microorganisms, include some types of lactic acid bacteria, spirochetes, mycoplasmas, rickettsiae, as well as *Corynebacterium pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, etc. (Sibirny, Fedorovych, Boretskyi et al., 2006; Abbas and Sibirny, 2011).

RF, entering the cell, is phosphorylated with the formation of its biologically active form, flavin mononucleotide (FMN), which attaches a residue of adenine nucleotide and turns into flavinadenine mononucleotide (FAD) (Bacher, 1991; Efimov et al., 1998; Mack et al., 1998; Abbas and Sibirny, 2011). These two flavin compounds binding as cofactors to many flavin-dependent proteins and regulatory factors, provide regulation of central biological processes.

The main regulatory property of flavins is the ability to transport electrons and protons, which makes them an integral link of redox chains in mitochondria and redox reactions in general (Beztsinna et al., 2016; Suwannasom et al., 2020). A number of other important processes in which these compounds participate are also known, among them: the formation of fetal nervous tissue, protection of mucous surfaces and skin. Flavins ensure the functioning of the visual and nervous systems. The important role of these compounds in the regulation of effective phagocytic immune response and the anticancer activity of the immune system has been described (Araki et al., 1995, Mazur-Bialy et al., 2013). Among the first signs of RF deficiency is inflammation of the mucous surfaces of the eye - conjunctivitis, increased photosensitivity. Dryness and cracking of the skin, occurrence of cheilitis, glossitis, cataracts, and migraines are also observed. In more complicated cases, the functions of the nervous and immune systems of the body are disrupted (Powers, 2003; Toyosawa et al., 2004a; Toyosawa et al., 2004b). RF deficiency in humans occurs rarely, mainly associated with metabolic disorders. However, in the field of animal husbandry, the lack of this vitamin is more common. The introduction of RF as a feed additive increases milk yield in cows, reduces the number of young cattle death and significantly increases egg production in hens (Sybirny, Fedorovych, Boretskyi et al., 2006).

Currently, RF is produced on an industrial scale by microbial synthesis. The best industrial producers include genetically modified bacteria *Bacillus subtilis* and mycelial fungi *Ashbya gossypii* (Stahmann et al., 2000; Abbas and Sibirny, 2011). On their basis, the production of the RF by the companies BASF, DSM and Hubei Guangji Pharmaceutical was established. The market of the RF production was about 400 million US dollars and in quantities of up to 12 thousand tons of this vitamin in 2021 (*Riboflavin Market – Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022-2027)*, 2022).

In the past, the strain dep8 *C. famata* was actively used for RF production by ADM company. However, due to the low genetic stability, using of this yeast strain

was stopped (Abbas and Sibirny, 2011). Therefore, obtaining stable recombinant strains of yeast *C. famata* is an important and promising direction of microbiology.

Advantages of using yeast over bacteria include their resistance to phage infection and lysis. Also, unlike mycelial fungi, yeasts are able to grow in simple liquid nutrient media and produce flavins in the exponential phase of growth. The ability of some types of yeast to grow on a cheap by-product of dairy industry – cheese whey (CW) deserves special attention. The natural disposal of CW is characterized by high oxygen consumption, rapid bacterial contamination and significant environmental pollution.

Currently, stable RF overproducers of *C. famata* yeast have been created. These include strains AF-4, created by classical mutagenesis, and strains BRP and BRPI further improved by genetic engineering (Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2020). However, the level of RF synthesis is still insufficient to establish profitable industrial production of this vitamin on their basis.

In this work, RF excretase (*RFE1*) and regulatory factor *SEF1* genes were additionally introduced to improve the above-mentioned *C. famata* RF overproducers. Overexpression of the *RFE1* gene led to a 1.5 fold increase in RF synthesis by BRP/*RFE1* recombinants compared to the BRP recipient strain. Recombinant BRP/*prLAC4-SEF1* strains were also constructed on the basis of BRP by introducing the gene for the positive regulation of RF synthesis *SEF1* under the control of the β -galactosidase gene promoter - *LAC4*, which is induced by lactose. Overexpression of the *SEF1* gene under the control of the *LAC4* promoter provided a 1,5-fold increase in the production of RF using CW as a nutrient medium. Analysis of the flavinogenic activity of yeast strains AF-4, BRP and BRP/*RFE1* also revealed the ability to a high level of synthesis of this flavin using CW.

It was established experimentally, that active growth and flavinogenesis of yeast in CW is possible only with the introduction of an additional source of Nitrogen in the form of urea, diammonium sulfate, etc. In addition, growth is observed only at

low concentrations of lactose (2-5%) in serum. The use of CW as a nutrient medium for microbial synthesis of RF will significantly reduce the cost of this production and ensure a reduction in environmental pollution by dairy industry waste.

The final part of the work was the construction of a new yeast producer of a bacterial antibiotic compound - aminoriboflavin (AF). Until now, no bacterial antibiotic producers have been created on the basis of yeast - a relatively phylogenetically distant species of microorganisms. Moreover, it should be taken into account that bacteria are classified as prokaryotic organisms, while yeast is classified as eukaryotic.

It is known that bacteria *Streptomyces davaonensis* and *Streptomyces cinnabarinus* producing the antibiotic roseoflavin (RoF) (Otani et al., 1974; Kasai et al., 1978; Matsui et al., 1979), which show a strong antimicrobial effect on a number of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms - *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Plasmodium falciparum*, etc. (Matsui et al., 1979; Jankowitsch et al., 2011; Hemasa et al., 2022). Unfortunately, due to its biological properties, this compound is also toxic to human cells. However, the metabolic precursor of RoF - AF exhibits a cytotoxic effect only on microorganisms and can be used in broad-spectrum antibacterial therapy. This difference in the manifestations and lack of cytotoxic action of RoF and AF (respectively) is explained by the inability of mammalian cells to transport AF through flavin transport systems into the cell, as well as the lack of catalytic conversion of AF into the cytotoxic analogue FAD - AFAD, unlike RoF (Pedrolli et al., 2011; Pedrolli et al., 2013).

The main advantage of AF is its selective antibiotic action against the whole spectrum of strains of *S. aureus* (Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017), which cause dangerous and common bacterial infections in surgical procedures and presence of open wounds. This problem is especially relevant in Ukraine during active hostilities, with a large number of wounded Ukrainian soldiers and civilians, required in many cases to provide the first emergency medical and surgical aid in

unsterile conditions. Long-term transportation of wounded people with open skin injuries and the lack of sterile conditions increase the risk of *S. aureus* infection in many times.

In addition, AF shows an antibacterial effect against methicillin-resistant mutant strains of MRSA (Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017), which are characterized by a high level of patient mortality. This opens up a great therapeutic potential of this compound in the treatment of infections caused by MRSA.

The level of RoF production by natural bacteria *S. davaonensis* is low. Its metabolic precursor AF is generally synthesized in trace amounts. Thus, these microorganisms are not used for the industrial production of AF or RoF by microbial synthesis. Currently, these flavins are obtained only by chemical synthesis in small quantities.

Taking into account that AF is formed from FMN, which in turn is synthesized from RF, we planned to create AF producers on the basis of *C. famata* FP (Flavinmononucleotide Producer) strain previously constructed in our department which produce a high amount of FMN (Yatsyshyn et al., 2009).

Biosynthesis of AF from FMN in bacteria occurs in several consecutive reactions with the participation of two enzymes - phosphatase and 8-dimethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphate synthetase (RosB enzyme). Phosphatase activity in the cells of microorganisms is usually constantly present at a sufficiently high level. Therefore, we decided to transfer the *rosB* gene of *S. davaonensis*, which encodes the bacterial enzyme RosB mentioned above, into the strain FP of yeast *C. famata*. Since, the codon system of DNA reading of yeast is slightly different compared to that of bacteria, namely: the triplet codon CUG of yeast encodes serine, and not leucine, as in bacteria (Voronovsky et al., 2004; Dmytruk and Sidirny, 2012), this feature was taken into account for cloning of the synthetic gene *rosB*.

Analysis of the flavinogenic activity of the obtained recombinant strains containing the *rosB* gene made it possible to identify a new fraction of flavin.

According to the retention factor (Rf) during chromatography, the obtained fraction corresponded to the published value for AF (Rf 0.10) (György and Pearson, 1967; Juri et al., 1987; Tyagi et al., 2009). The mass spectrometric analysis clearly confirmed that this compound is AF. AF production in the culture medium of FP/RosB *C. famata* recombinants reached 5 mg/l. AF synthesis in nature is carried out only by prokaryotic microorganisms. For the first time, we obtained AF production in a eukaryotic organism - the yeast *C. famata*.

Further improvement of the constructed FP/RosB producer *C. famata* for increasing the AF production level is a promising direction of research necessary for the development and establishment of industrial microbial synthesis of this antibiotic compound.

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ

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

1. Ruchala J, Andreieva Y, **Tsyurulnyk A**, Sobchuk S, Najdecka A, Wen L, Kang Y, Dmytruk O, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. Cheese whey supports high riboflavin synthesis by the engineered strains of the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Microb Cell Fact*. 2022; 21(1):161-169. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
2. **Tsyurulnyk A**, Fedorovych D, Dmytruk K, Sibirny A. Overexpression of Riboflavin Excretase Enhances Riboflavin Production in the Yeast *Candida famata*. *Methods Mol Biol*. 2021; 2280:31-42. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
3. **Tsyurulnyk A**, Andreieva Y, Ruchala J, Fayura L, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. Expression of yeast homolog of the mammal *BCRP* gene coding for riboflavin efflux protein activates vitamin B2 production in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Yeast*. 2020; 37 (9-10):467-473. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
4. **Tsyurulnyk A**, Kordiaka R, Dmytruk K, Fedorovych D, Sybirny A. Optimization of the cultivation conditions and the basic molecular tools for roseoflavin producer *Streptomyces davawensis*. *Mikrobiol Z*. 2016; 78(4):2-10. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
5. **Цирульник А**, Дмитрук К, Федорович Д, Сибірний А. Розробка платформи для конструювання надпродуцентів амінірибофлавіну на основі

флавіногенних дріжджів *Candida famata*. Вісник Львівського університету. 2016; (73):336-341. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).

6. **Цирульник А**, Федорович Д, Колодій О, Дмитрук К, Сибірний А. Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну). Пат. на винахід 122821 Україна, МПК С12N1/19 С12Р 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. - №а201811788; заявл. 29.11.2018; опубл. 06.01.2021, Бюл. № 1. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних).

7. **Цирульник А**, Федорович Д, Колодій О, Дмитрук К, Сибірний А. Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну). Пат. на корисну модель 133594 Україна, МПК С12N1/19 С12Р 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. - №u201811789; заявл. 29.11.2018; опубл. 10.04.2019, Бюл. № 7. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних).

8. Дмитрук К, Сибірний А, Фаюра Л, Федорович Д, **Цирульник А**. Спосіб отримання флавінового антибіотика амінорибофлавіну. Пат. на корисну модель 152271 Україна, МПК С12N1/19 С12Р 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. - №u202201605; заявл. 18.05.2022; опубл. 11.01.2023, Бюл. № 2. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних).

9. **Tsyurulnyk A**, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. Yeast *Candida famata* as a producer of riboflavin and its derivatives. 7 th international Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P.34.

10. Fedorovych D, **Tsyurulnyk A**, Kolodii O, Boretsky Y, Dmytruk K, Sibirny A. Expression of putative riboflavin excretase *BCRP* in the flavinogenic yeasts. International Conference: Advances in Microbiology and Biotechnology; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P.61.

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

18. Fedorovych D, **Tsyulnyk A**, Ruchala J, Vojtun A, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of the Advanced Producer of Riboflavin on Whey in the Flavinogenic Yeast *Candida famata*. World Microbe Forum; 2021 June 20-24; online.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
SUMMARY.....	8
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ.....	14
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	31
1.1. Рибофлавін, його роль та основні функції в метаболізмі клітини ..	31
1.2. Біосинтез рибофлавіну	35
1.3. Регуляція біосинтезу рибофлавіну.....	41
1.3.1. Регуляція біосинтезу рибофлавіну в бактерій.....	41
1.3.2. Регуляція біосинтезу рибофлавіну в дріжджів	42
1.3.3. Регуляція біосинтезу рибофлавіну в міцеліальних грибів.....	48
1.4. Система транспорту флавінів у дріжджів.....	50
1.4.1. РФ-пермеази I і II.....	51
1.4.2. РФ-екскретаза.....	53
1.5. Основні підходи до конструювання промислових надсинтетиків рибофлавіну.....	56
1.6. Біосинтез розеофлавіну та амінорибофлавіну бактеріями <i>Streptomyces davaonensis</i> і механізми їхньої антибіотичної дії.....	63
1.7. Підсумок.....	67

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	68
2.1. Матеріали досліджень.....	68
2.2. Штами мікроорганізмів.....	68
2.3. Плазмідни.....	69
2.4. Праймери.....	69
2.5. Культуральні середовища.....	71
2.6. Програмне забезпечення для аналізу нуклетотидних послідовностей.....	74
2.7. Базові молекулярно генетичні методи.....	75
2.7.1. Виділення плазмідної ДНК з бактерійних клітин.....	75
2.7.2. Виділення сумарної ДНК з дріжджових клітин.....	76
2.7.3. Полімеразноланцюгова реакція.....	77
2.7.4. Полімеразноланцюгова реакція у реальному часі.....	77
2.7.5. Конструювання плазмід із експресійними касетами.....	78
2.7.6. Трансформація дріжджів <i>Candida famata</i>	79
2.8. Біохімічні методи.....	79
2.8.1. Аналіз продукції флавінів та визначення біомаси.....	80
2.8.2. Визначення вмісту флавінів у клітинах дріжджів.....	80
2.8.3. Отримання безклітинних екстрактів.....	81
2.8.4. Визначення концентрації білка у безклітинному екстракті.....	81
2.8.5. Визначення активності ГТФ-циклогідролази II.....	81

2.9. Статистичний аналіз експериментальних даних.....	82
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	83
3.1. Конструювання рекомбінантних штамів <i>Candida famata</i> із надекспресією гена РФ-екскретази дріжджів <i>Debaryomyces hansenii</i> - <i>RFE1_Dh</i>	83
3.1.1. Аналіз флавіногенної активності рекомбінантних штамів <i>Candida famata</i> , що експресують ген <i>RFE1_Dh Debaryomyces hansenii</i> у різних середовищах.....	87
3.1.2. Вплив різних джерел Нітрогену в складі поживного середовища на продукцію рибофлавіну рекомбінантними штамми BRP/RFE1 <i>Candida famata</i>	93
3.1.3. Аналіз флавіногенної активності штамів BRP та BRP/RFE1 <i>Candida famata</i> у разі використання молочної сироватки як поживного середовища.....	97
3.1.4. Аналіз флавіногенної активності рекомбінантних штамів <i>Candida famata</i> які експресують ген <i>RFE1_Dh Debaryomyces hansenii</i> із використанням гліцеролу як джерела Карбону.....	107
3.1.5. Розробка лабораторного регламенту отримання рибофлавіну із використанням сконструйованого штаму BRP/RFE1 <i>Candida famata</i> ...	110
3.2. Конструювання штамів дріжджів <i>Candida famata</i> із надекспресією гена транскрипційного фактора Sef1 під контролем лактозо- індуцибельного промотора <i>LAC4</i>	116
3.2.1. Конструювання штамів дріжджів <i>Candida famata</i> які експресують ген <i>SEF1 C. famata</i> під контролем промотора <i>LAC4</i>	

<i>C. famata</i>	117
3.2.2. Флавіногенна активність рекомбінантних штамів <i>Candida famata</i> які експресують додаткову копію гена <i>SEF1</i> під контролем промотора <i>LAC4</i> за різних умов вирощування.....	120
3.3. Конструювання рекомбінантного штаму дріжджів <i>Candida famata</i> із здатністю до синтезу антибіотичної сполуки амінорибофлавіну.....	125
3.3.1. Конструювання плазмід, що містить ключовий ген біосинтезу амінорибофлавіну - <i>rosB</i> бактерій <i>Streptomyces davaonensis</i> та одержання на її основі рекомбінантних штамів <i>Candida famata</i>	126
3.3.2. Аналіз різних форм флавінів культуральної рідини <i>Streptomyces davaonensis</i> та рекомбінантних штамів FP/ <i>rosB</i> <i>Candida famata</i>	130
3.4. Підсумок.....	134
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	136
ВИСНОВКИ.....	146
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	148
ДОДАТОК 1.....	174

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

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

Рибофлавін (РФ) – це вітамін В₂ або 7,8-диметил-10-(1'-D-рибітил) ізоалоксазин, що є метильованим похідним трициклічної сполуки ізоалоксазину і спирту рибітолу (Dym and Eisenberg, 2001). Тривіальна назва РФ та інших сполук цієї групи походить від лат. слова *flavus* - жовтий, що характеризує їх яскраво жовто-оранжеве забарвлення не лише за денного світла але і в ультрафіолетовому спектрі та «рибо» від слова рибітол.

Потрапляючи в організм, РФ перетворюється у свої біологічно активні форми – флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД), які залучені у регуляцію багатьох біологічних процесів, серед яких енергетичний обмін (Beztsinna et. al., 2016; Suwannasom et al., 2020; Henriques et al., 2021), формування імунної відповіді, розвиток і функціонування нервової системи, метаболізм амінокислот, вітамінів (В₃, В₆, В₉), детоксикація ароматичних сполук та важких металів, мікросомальне окислення, біолюмінісценція, фототропізм, ДНК-репарація, індукція оксидативного стресу та захист клітини від нього (Liu Shuang et al., 2020, Wang et al., 2021) а також сприяють мобілізації феруму (Averianova et al., 2020). Від 1 до 3% генів бактерійних та еукаріотичних геномів кодують білки, що використовують як кофактор флавіни. Беручи до уваги широкий спектр дії цих сполук, флавіни вважають одними із найпоширеніших універсальних біохімічних регуляторів. Дефіцит РФ спричиняє сповільнення росту плода, порушення функціонування слизових оболонок, зорового аналізатора та нервової системи. Його активно використовують для лікування катаракти, мігрені, малярії, хвороби Паркінсона, дерматозів різної етіології та ін. Ці дослідження висвітлені у ряді оглядів: Powers, 2003; Toyosawa et al., 2004a; Toyosawa et al., 2004b; Thakur et al., 2017; Saedisomeolia 2018; Urits et al., 2020; Plantone et al., 2021. Людський організм нездатний до власного ендогенного синтезу цього вітаміну і його надходження забезпечується головним чином із продуктів харчування.

Особливої уваги заслуговують флавінові сполуки, що проявляють не про-, а антибіотичну дію. До них належать похідні РФ - розеофлавін (РоФ) та його метаболічний попередник амінорибофлавін (АФ) (Otani et al., 1974; Kasai et al., 1978; Matsui et al., 1979; Schwarz et al., 2016). Ці сполуки синтезують у природі ґрунтові бактерії *Streptomyces davaonensis* та *Streptomyces cinnabarinus*. Вони виявляють виражену цитотоксичну дію на низку патогенних бактерій, зокрема, золотистий стафілокок *Staphylococcus aureus* та його метицилін-резистентні штами MRSA (Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017). Це відкриває перспективи для створення нових антибактерійних препаратів для ефективної боротьби зі складними інфекційними захворюваннями спричиненими високо вірулентними штамами *S. aureus*.

У минулому РФ отримували шляхом хімічного синтезу та мікробної ферментації. В останні роки промислове виробництво РФ проводять лише за використання рекомбінантних штамів мікроорганізмів-надсинтетиків РФ, що є значно рентабельнішим та екологічно вигіднішим. Ці результати висвітлені у ряді праць: Stahmann et al., 2000, Lim et al., 2001; Schwechheimer et al., 2016; Revuelta et al., 2017; Acevedo-Rocha et al., 2019; Liu Shuang et al., 2020; Averianova et al., 2020; You et al., 2021. Крім цього, використання біологічних об'єктів дозволяє суттєво знизити рівень утворення небажаних побічних продуктів та підвищити ступінь чистоти кінцевого продукту (Zu Berstenhorst et al., 2009; Belenky et al., 2011; Eggersdorfer et al., 2012).

На сьогоднішній день, виробництво РФ здійснюють головню з використанням генетично модифікованих штамів бактерій *Bacillus subtilis* та міцеліальних грибів *Ashbya gossypii*. Таке виробництво налагоджене компаніями BASF, DSM та Hubei Guangji Pharmaceutical. Світовий ринок РФ станом на 2021 на рік складає близько 400 мільйонів американських доларів при виробництві цього вітаміну до 12 тис. тон на рік (*Riboflavin Market – Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022-2027)*, 2022). Основну частину (до 80%) одержаного РФ використовують у галузі тваринництва для

виробництва кормів (Kato and Park, 2012; Averianova et al., 2020). Решту – застосовують у харчовій, медичній та косметологічній промисловостях.

Конструювання нових та покращення існуючих мікробних штамів-надсинтетиків РФ є важливим напрямком сучасної мікробіології, основною метою якого є здешевлення та підвищення виходу РФ на одиницю використаного субстрату.

Слід зауважити, що отримання згаданих вище антибіотичних похідних РФ - РоФ та АФ здійснюється лише хімічним шляхом і в невеликих кількостях, що не дозволяє активно використовувати ці сполуки у клінічних випробуваннях та медичній практиці. Тому, конструювання нових та ефективних рекомбінантних штамів дріжджів, здатних до надсинтезу бактерійних сполук РоФ і АФ, є абсолютно новим та пілотним напрямком досліджень, розпочатим саме у нашому відділі - молекулярної генетики і біотехнології, Інституту біології клітини НАН України у Львові.

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

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у межах наукових тем Інституту біології клітини НАН України: «Генетичний контроль біосинтезу та транспорту рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (№ держ. реєстрації 0115U001362, 2015-2019); «Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмів: алкогольної ферментації, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глутатіону» (№ держ. реєстрації 0116U002209, 2016-2019); «Вивчення механізму дії нових генів в регуляції синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Candida famata*» (№ держ. реєстрації 0119U001677, 2019-2020); «Ідентифікація та з'ясування ролі нових структурних та регуляторних генів у надсинтезі рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (№

держ. реєстрації 0121U10926, 2021-2025) та українсько-австрійського проєкту «Рекомбінантні штами дріжджів *Komagataella phaffii*, що продукують флавінові антибіотики амінорибофлавін та розеофлавін» (№ держ. реєстрації 0120U103405, 2020-2021); НФДУ «Створення дріжджових продуцентів нових флавінових антибіотиків» (№ держ. реєстрації 0120U104114, 2020-2021).

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

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

1. З'ясувати можливості посилення продукції РФ дріжджами *C. famata* завдяки надекспресії дріжджового гомолога гена РФ-екскретази *BCRP1* ссавців – *RFE1* *Dh*.
2. Сконструювати покращені штами-надсинтетики РФ дріжджів *C. famata* шляхом надекспресії гена транскрипційного фактора *SEF1* під контролем лактозо-індуцибельного промотора *LAC4*.
3. Проаналізувати можливість використання відходів виробництва молочної продукції – молочної сироватки та виробництва біопалива – неочищеного технічного гліцеролу як культуральних середовищ для мікробного синтезу РФ.
4. Сконструювати дріжджові продуценти бактерійної антибіотичної сполуки АФ за використання гетерологічної експресії модифікованого гена *rosB* бактерій *S. dawaonensis* у дріжджовому надсинтетику ФМН *C. famata*.

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

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

Методи досліджень

Для конструювання та аналізу одержаних рекомбінантних штамів дріжджів *C. famata* використовували генетичні, мікробіологічні та біохімічні методи: полімеразну ланцюгову реакцію, ендонуклеазну рестрикцію ДНК, лігування фрагментів ДНК, генетичну трансформацію бактерій і дріжджів. Також широко використовували комп'ютерні бази даних відповідних генів та методи комп'ютерного аналізу. Кількісну оцінку флавіногенної активності проводили з використанням методів флуориметрії, спектрофотометрії, мас-спектрометрії та хроматографічного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів

Встановлено, що надекспресія введеного у дріжджі *C. famata* дріжджового гена РФ-екскретази *RFE1_Dh*, який знайдений як аналог гена *BCRP1* ссавців, викликає значне збільшення продукції РФ. Одержані результати мають важливе значення для подальшого вивчення ролі механізмів транспорту флавінів у процесах регуляції продукції РФ у дріжджів. Це відкриває нові шляхи для створення та покращення існуючих дріжджових надсинтетиків РФ. Виявлено суттєве збільшення рівня продукції РФ у штамів *C. famata* які містять додатково введений ген транскрипційного фактора *SEF1*. Використання лактозо-індуцибельного промотора дозволило досягнути збільшення продукції РФ у середовищах з лактозою, що підтверджує важливу роль цього транскрипційного фактора в активації флавіногенезу. Встановлено, що дріжджі *C. famata* здатні рости і синтезувати РФ у середовищах, які містять лактозу як єдине джерело Карбону, зокрема, дешевий побічний продукт виробництва сирів – молочну сироватку. Підтверджено здатність до незначного росту дріжджів

C. famata у середовищі з очищеним гліцеролом, проте росту не спостерігали при використанні неочищеного гліцеролу, незважаючи на застосування детоксикуючого агента – глауконіту. Вперше, методом генної інженерії створено дріжджовий продуцент амінірибофлавіну – бактерійної антибіотичної сполуки. Введення адаптованого до дріжджової кодонової системи бактерійного гена *rosB* *S. davaonensis* у дріжджовий надсинтетик ФМН *C. famata* дозволило отримати рекомбінантний штам, здатний синтезувати АФ. Ця флавінова сполука виявляє бактеріостатичну дію проти золотистого стафілокока, в т. ч. його метицилін-резистентних штамів MRSA, і є потенційним протиінфекційним лікарським препаратом.

Практичне значення одержаних результатів

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

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

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

Особистий внесок здобувача

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

Апробація результатів дисертації

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

Публікації

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

Структура та обсяг дисертації

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

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Рибофлавін, його роль та основні функції в метаболізмі клітини

Рибофлавін (РФ, вітамін В₂), або 7,8-диметил-10-(1'-D-рибітил) ізоалоксазин (Dym and Eisenberg, 2001), відкритий у 1879 році як жовтий пігмент молока. Хімічна будова цього вітаміну встановлена в 30-х роках ХХ століття. У сухому вигляді РФ - це порошкоподібна речовина із жовто-оранжевих кристалів. У розчині він стійкий до нагрівання, проте руйнується на світлі. Молекулярна маса РФ становить 376,4. Сполука має доволі низьку розчинність, близько 100 мг/л за 25° С. Добова норма РФ для людини становить близько 1,5 мг. Людський організм нездатний його синтезувати, тому основним шляхом надходження цього вітаміну є споживання продуктів харчування із високим вмістом РФ, до яких належать м'ясні субпродукти, молочні продукти, дріжджі, горіхи, гриби та деякі сорти риби. Оскільки зайві кількості РФ легко виводяться з організму із сечею, токсична дія цього вітаміну у разі його надмірного споживання не встановлена. Потрапляючи у клітини, РФ перетворюється у свої біологічно активні форми - ФМН і ФАД, що є коферментами для цілого ряду флавін-залежних біохімічних реакцій (Рис. 1.1) (Abbas and Sibirny, 2011).

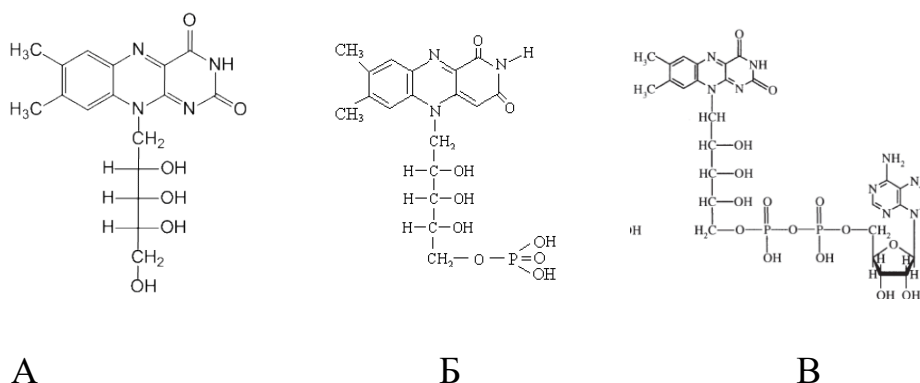


Рис. 1.1. Структурні формули: А – рибофлавін, Б – флавінмононуклеотид, В – флавінаденіндинуклеотид (Abbas and Sibirny, 2011).

Будь-які порушення в засвоєнні та метаболізмі організмом цього вітаміну спричиняють важкі патологічні стани. Зовнішніми ознаками недостатчі РФ є патології слизових оболонок, злущування епітелію, тріщини оболонки губ, дерматити, глосити, стоматити. Окремо слід відзначити порушення функціонування органів зору (кон'юнктивіти, світлочутливість, катаракта) (Powers, 2003; Toyosawa et al., 2004a; Toyosawa et al. 2004b). Відомо, що асоційовані з мембраною флавопротеїни у відповідь на дію світла фосфорилуються та використовуючи ФМН як хромофор, функціонують як фоторецептори. Флавіни беруть участь у фоторепарації ДНК та каспазо-Р450-незалежній регуляції апоптозу. Взаємодіючи із цитохромом Р₄₅₀, флавіни залучені у метаболізм лікарських та токсичних сполук (Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006).

Завдяки здатності флавінів до процесу зворотного окислення/відновлення, однією із основних функцій цих сполук в організмі людини є регуляція енергетичного обміну та участь у численних окисно-відновних реакціях. Атоми Нітрогену ізоаллоксазинового кільця зв'язують/віддають два атоми гідрогену у разі перегрупування подвійних зв'язків всередині кільця. Це дозволяє похідним РФ виступати важливими посередниками у процесі переносу електронів і протонів, а також забезпечувати функціонування електронтранспортного ланцюга в мітохондріях (Рис. 1.2) (Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006; Suwannasom et al., 2020).

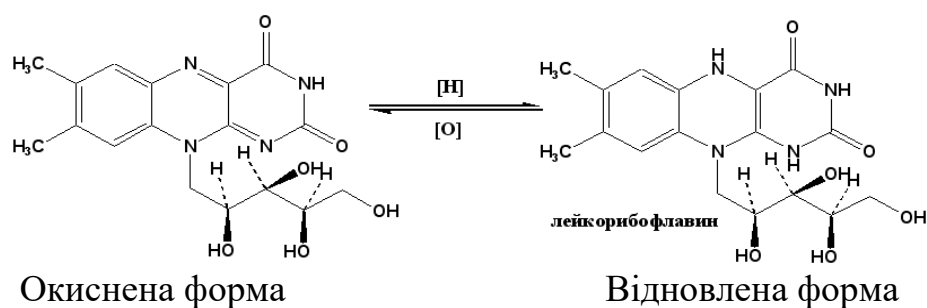


Рис. 1.2. Перетворення окисненої форми рибофлавіну у відновлену та навпаки за участі електронів та протонів водню.

У формі коферментів ФМН та ФАД, РФ каталізує окиснення відновленого НАДН.Н⁺ ($\text{НАДН.Н}^+ + \text{ФАД} = \text{НАД}^+ + \text{ФАДН}_2$). Завдяки сильному окисно-відновному потенціалу флавіни забезпечують функціонування редокс центрів важливих метаболічних ферментів: сукцинат- і НАДН-дегідрогенази, ксантиноксидази, NO-синтази та цитохрому P₄₅₀. Також РФ бере участь у метаболізмі жирних кислот, амінокислот, холіну, вітаміну В₃ (ніацину), В₆ (піридоксину) та В₉ (фолієвої кислоти). Бактерії *Propionibacterium shermanii* синтезують із ФМН нуклеотидну частину вітаміну В₁₂ (ціанкобаламіну). Вважають, що продукція вільних флавінів бактеріями *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* та бактеріями роду *Shewanella* у зовнішнє середовище приводить до редукції іонів Fe³⁺ та забезпечує поглинання цього іона клітинами, що є важливою складовою хемотрофного живлення. Загалом, на сьогоднішній день відомо близько 150 ферментів та білків, які безпосередньо взаємодіють із флавінами, що робить їх найбільш універсальними каталізаторами метаболізму (Suwannasom et al., 2020; Abbas and Sibirny, 2011; Lei et al., 2021; Tolomeo et al., 2021; Olfat et al., 2022).

Цей вітамін залучений у механізми антиоксидантного захисту клітин організму від активних форм кисню, що виникають у результаті гострих запальних реакцій, цим самим запобігаючи пошкодженню функціонування органів та старінню організму в цілому. Для прикладу, глутатіонредуктаза, яка є ФАД - залежним ферментом, забезпечує захист клітин від гідропероксидів. Захисна протизапальна дія РФ підтверджена у випадку таких захворювань, як сепсис, цукровий діабет, стенокардія, дихальна та серцева недостатності, гостра та хронічна гіпоксії, запалення слизових оболонок. Також значний терапевтичний ефект РФ виявлений під час лікування малярії і підтриманні мікробіоти кишечника в нормі, що підтверджено чисельними дослідженнями: Powers, 2003; Toyosawa et al., 2004a; Toyosawa et al., 2004b; Thakur et al., 2017; Saedisomeolia et al., 2018; Suwannasom et al., 2020; Urits et al., 2020; Plantone et al., 2021.

Важлива роль цього вітаміну встановлена і для функціонування імунної системи. Показано, що РФ здатний пригнічувати міграцію, накопичення та інфільтрацію активованих гранулоцитів та Т-лімфоцитів у периферійних тканинах, в тому числі у разі трансплантації тканин і органів, що приводить до зниження імунологічної відповіді та відторгнення трансплантованих тканин. Хоча, існують дані і щодо можливої прозапальної активності цього вітаміну, головню, шляхом активації фагоцитарної активності нейтрофілів, моноцитів, сприянню виживання та проліферації імунокомпетентних клітин (Thakur et al., 2017; Saedisomeolia et al., 2018; Peterson et al., 2020; Suwannasom et al., 2020).

Дефіцит РФ вважають додатковим фактором ризику виникнення та розвитку онкологічних захворювань, хоча однозначних прямих доказів немає. Для прикладу, було продемонстровано суттєвий інгібуючий ефект РФ на формування метастазів меланоми легень на тваринних моделях. Виявлено зменшення ризику розвитку колоректального раку та раку легень за дії РФ. Цікаво, що високі дози цього вітаміну захищають організм від токсичного впливу гепатоканцерогенів. Також РФ виконує захисну функцію у випадку опромінення легневих фіброblastів ембріонів. Ще один позитивний терапевтичний ефект вітаміну полягає у підвищенні ефективності хемотерапевтичної дії одного із ключових протиракових агентів – карботетрахлориду (Thakur et al., 2017; Shey et al., 2018; Zumwalde et al., 2020; Peterson et al., 2020).

Беручи до уваги важливу роль РФ у регуляції цілої низки фізіологічних процесів, значний терапевтичний потенціал у разі лікування патологій, а також високу практичну цінність як кормової добавки у тваринництві, мікробний синтез цього вітаміну за використання генетично модифікованих мікроорганізмів у промислових масштабах є перспективним напрямком сучасної мікробіології та біотехнології.

1.2. Біосинтез рибофлавіну

Високий рівень біосинтезу РФ виявлений головню у мікроорганізмів та значно нижчий він у рослин. Деякі мікроорганізми які здатні до надпродукції цього вітаміну за певних умов вирощування, складу культуральних середовищ і додаткових генетичних модифікацій, одержали назву - флавіногенні (Табл. 1.1) (Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006; Fisher and Bacher, 2006; Abbas and Sibirny, 2011).

Таблиця. 1.1

Флавіногенні мікроорганізми

(Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006)

Організм	Причини надсинтезу	РФ, мг/л	Посилання
<i>Bacillus subtilis</i>	Мутації регуляторних генів Те ж + ампліфікація <i>rib</i> оперону	600 3000	Черник и др., 1974 Stepanov et al., 1984
<i>Micrococcus lactis</i> N41	Середовище з вуглеводнями	20	Помозгова и Логинова, 1970
<i>Micrococcus glutamicus</i>	Невідома мутація	126	Tanaka and Nakamura, 1966
<i>Eremothecium ashbyii</i>	Невідома мутація	10 000	Demain, 1980
<i>Ashbya gossypii</i>	Невідома мутація	15 000	Demain, 1980 Bigelis, 1989

Організм	Причини надсинтезу	РФ, мг/л	Посилання
<i>Candida robusta</i>	Дефіцит Феруму Середовище з кальцієм	340	Такао, 1964
<i>Schwanniomycetes occidentalis</i>	Дефіцит Феруму	200	Трач и Шавловський, 1976
<i>Pichia guilliermondii</i>	Дефіцит Феруму Мутації в системі транспорту Феруму Мутації регуляторного гена	175 110 100	Tanner et al., 1945 Шавловский и др., 1975 Шавловський и др., 1976
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY-2	Невідома мутація	119	Giri and Krishnasawamy, 1954
<i>Candida famata</i> ATCC20850	Невідомі мутації Умови вирощування	10 000	Heefner et al., 1992
<i>Candida guilliermondii</i>	Невідома мутація	3 518	Wang and Pan, 1994

Шляхи біосинтезу РФ у бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів та рослин загалом схожі, за виключенням другого і третього етапів біосинтезу - послідовностей реакцій дезамінування і відновлення проміжних сполук (Weimar and Neims, 1975; Шавловський и Логвиненко, 1988). Перші дослідження процесів флавіногенезу почали ще в 1950 році. Їх проводили шляхом аналізу проміжних сполук синтезу в РФ-залежних мутантів *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. guilliermondii*, *C. famata* та *A. gossypii* (Fischer and Bacher, 2006). Використання підходів генної інженерії, зокрема делеції та надекспресії генів флавіногенезу, забезпечило виявлення всіх структурних та більшості регуляторних генів, а також їх білкових продуктів, що залучені у біосинтез

флавінів (Табл. 1.2). Невідомим залишається лише тип фосфатази та відповідний ген.

Таблиця. 1.2

**Гени біосинтезу рибофлавіну в мікроорганізмів та їх біохімічні функції
(Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006)**

Фермент біосинтезу РФ	Позначення кодуючих генів			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
ГТФ- циклогідролаза	<i>ribA</i>	<i>RibA</i>	<i>RIB1</i>	<i>RIB1</i>
2,5-діаміно-4-гідрокси-6-рибозиламінопіримідин-5'-фосфатдезаміназа	не ідентифікований	<i>RibG</i>	відсутній	відсутній
2,4-диокси-5-аміно-6-рибозиламінопіримідин-5'-фосфатредуктаза	-“-	<i>ribD</i>	-“-	-“-
2,5-діаміно-4-гідрокси-6-рибозиламінопіримідин-5'-фосфатредуктаза	відсутній	відсутній	<i>RIB2</i>	<i>RIB7</i>
2,5-діаміно-4-гідрокси-6-рибітиламинопіримідин-5'-фосфатдезаміназа	-“-	-“-	<i>RIB3</i>	<i>RIB2</i>
ДМРЛ-синтаза	<i>ribC</i>	<i>ribF</i>	<i>RIB5</i>	<i>RIB3</i>
3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза	не ідентифікований	не ідентифікований	<i>RIB6</i>	<i>RIB4</i>
РФ-синтаза	<i>rib</i>	<i>ribB</i>	<i>RIB7</i>	<i>RIB6</i>
Фермент, що каталізує синтез 6-метил-7-(1,2-диоксиетил)-8-рибітиллюмазину	не знайдений	<i>ribH</i>	відсутній	відсутній

Найкраще досліджено механізми регуляції біосинтезу РФ у бактерій *B. subtilis*, оскільки генетично модифіковані штами саме цього мікроорганізму вважають кращими промисловими надпродуцентами вітаміну В₂ та активно використовують у сучасному виробництві (Perkins et al., 1999). Детальний огляд процесу біосинтезу РФ та його регуляції на генетичному рівні в мікроорганізмів описано у працях: Fischer and Bacher, 2005; Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006; Abbas and Sibirny, 2011; Westman et al., 2012; Kundu et al., 2019; LeBlanc et al., 2020; Kayastha et al., 2021; Meruvu et al., 2021; Wang et al., 2022.

Створення ауксотрофних мутантів, дозволило встановити шляхи біосинтезу РФ та включені в цей процес гени. Встановлено, що структурні гени біосинтезу РФ у *B. subtilis* формують групи та організовані за типом оперонів у наступній послідовності: *ribG*, *ribA*, *ribB*, *ribF*, *ribT*, *ribD*, *ribH* і займають на генетичній карті відстань у 5×10^6 дальтон. Ця область транскрибується як одна довга молекула РНК розміром близько 4300 нуклеотидів (Bresler et al., 1972; Perumov et al., 1980; Mironov et al., 1989; Perkins and Pero, 2001). Аналіз геномної локалізації генів біосинтезу РФ у *E. coli* показав, що на відміну від *B. subtilis*, структурні гени цієї бактерії не зчеплені між собою (Бандрин и др., 1983).

Дослідження синтезу РФ у дріжджів започатковано та проведено у Львові проф. Шавловським Г. М. (Львівський державний університет ім. І. Франка). Було встановлено, що синтез РФ у дріжджів *P. guilliermondii* відбувається шляхом перетворення однієї молекули гуанозин-5-трифосфату (ГТФ, одержаної з шляху синтезу пуринів *de novo*) і двох молекул рибулозо-5-фосфату (утворені в пентозофосфатному шляху). Процес каталізують 7 ферментів, що кодуються генами *RIB1*, *RIB 2*, *RIB 3*, *RIB 4*, *RIB 5*, *RIB 6*, *RIB 7*, відповідно. ГТФ-циклогідролаза II (КФ 3.5.4.25) (кодується геном *RIB1*), забезпечує гідроліз ГТФ до пірофосфату та 2,5-діаміно-4-гідрокси-6-рибозил-амінопіримідин-5'-фосфату (ДАРПФ). Цей фермент у *P. guilliermondii* є алостеричним білком та

інгібується кінцевим продуктом біосинтезу РФ - ФАД та рядом інших нуклеотидів (5'-АМФ, АДФ, АТФ, НАД і НАДФ) (Abbas and Sibirny, 2011).

Наступними етапами є процеси відновлення, дезамінування бічного рибозильного ланцюга та дефосфорилювання ДАРПФ з утворенням 5-аміно-6-(рибітиламіно)-2,4 (1Н,3Н)-піримідиндіону. Фермент 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат-синтаза вищеплює 4-карбонову основу як форміат. Передостаннім кроком є конденсація цієї сполуки із 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатом із утворенням 6,7-диметил-8-рибітил-люмазину (ДМРЛ), що каталізується люмазин синтазою. Останнім етапом біосинтезу РФ є реакція дисмутації двох молекул ДМРЛ за участі ферменту РФ- синтази. У результаті, одна молекула ДМРЛ перетворюється на РФ, а новоутворена 5-аміно-6-(рибітиламіно)-2,4(1Н,3Н)-піримідиндіон використовується як субстрат у попередніх реакціях цього каскаду (Abbas and Sibirny, 2011, Рис. 1.3).

Оскільки основні біологічні функції РФ проявляє у вигляді похідних ФМН та ФАД, слід також розглянути дві наступні реакції синтезу згаданих похідних. Перетворення РФ у ФМН і ФАД вже здатне відбуватися в клітинах людини та тварин. У прокаріот, ці реакції каталізуються одним біфункціональним ферментом. В еукаріотичних організмів послідовний синтез ФМН і ФАД забезпечують два різні ферменти - РФ - кіназа (флавокіназа, ФМН-синтетаза, АТФ: РФ-5'-фосфотрансфераза; КФ 2.7.1.26) та ФАД синтетаза (ФАД-пірофосфорилаза, ФМН-аденілілтрансфераза, АТФ:ФМН-аденіліл-трансфераза; КФ2.7.7.2), відповідно. Спочатку РФ-кіназа фосфорилює РФ із утворенням ФМН. Далі ФАД-синтаза каталізує приєднання молекули АТФ з утворенням ФАД та ФФН. Гени які кодують ці ферменти у дріжджів, отримали назву *FMNI* та *FAD1*, відповідно (Рис. 1.3). Метаболічні шляхи утворення флавінів у міцеліальних грибів *E. ashbyii* та *A. gossypii* володіють рядом схожих ознак. Проте характерною для гриба *E. ashbyii* є здатність до синтезу великих кількостей не лише РФ але і ФАД (Abbas and Sibirny, 2011, Рис. 1.3).

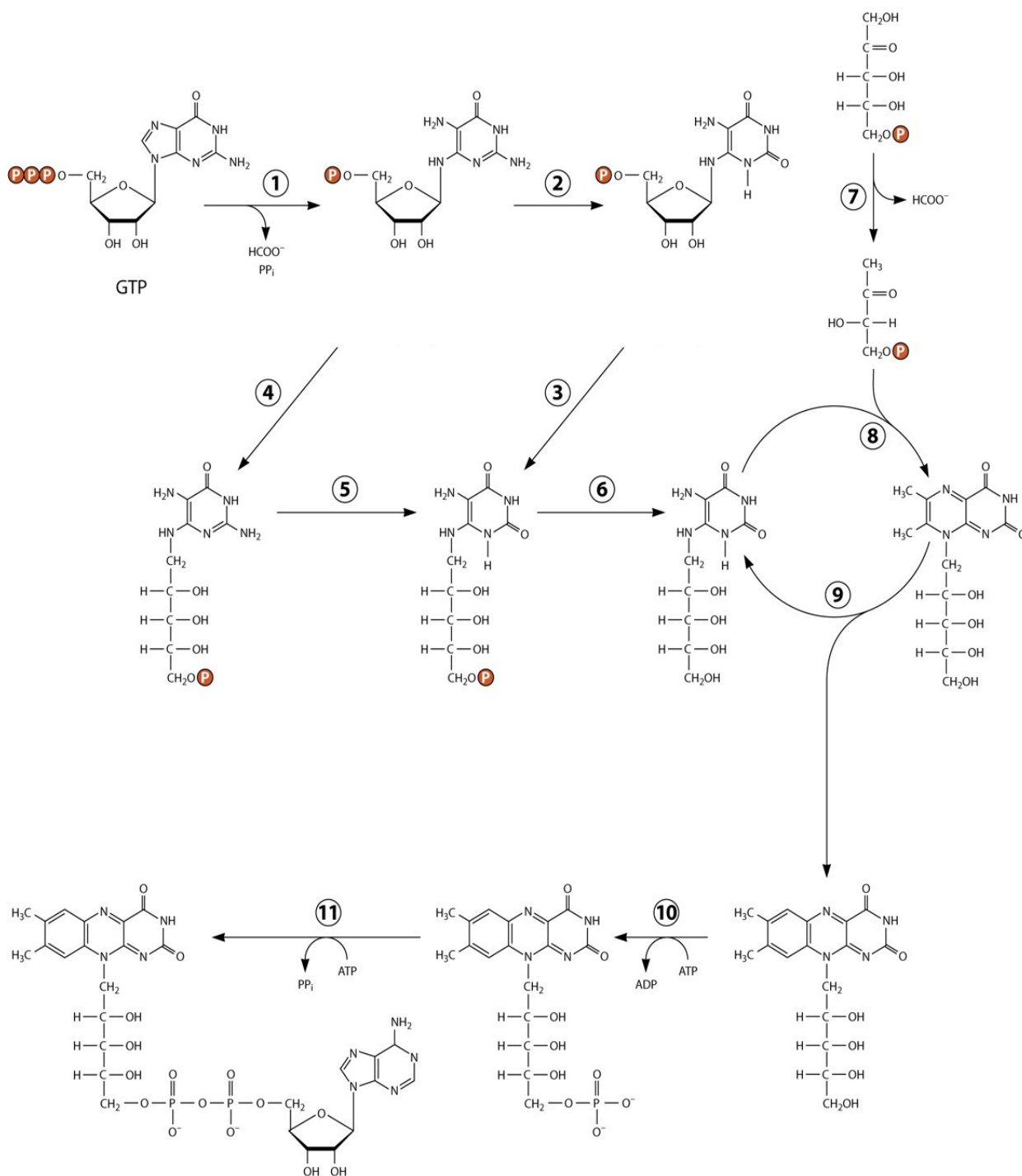


Рис. 1.3. Шлях синтезу рибофлавіну у дріжджів (Abbas and Sibirny, 2011): 1 - ГТФ циклогідролаза II, 2 - деаміназа, 3 - редуктаза, 4 - 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4-(3Н)-пиримідинон-5'-фосфат редуктаза, 5 - 2,5-діаміно-6-рибітиламіно-4-(3Н)-пиримідинон-5'-фосфат деаміназа, 6 - фосфатаза, 7 - 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат синтаза, 8 - 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин синтаза, 9 - рибофлавін синтаза, 10 - рибофлавін кіназа, 11 - ФАД-синтетаза.

Саме процес утворення функціонально неактивних конкурентних аналогів ФМН та ФАД на основі флавінових антибіотиків АФ та РоФ є перспективним напрямком розробки нових антибіотичних засобів, про який уже згадувалось раніше та буде йти мова в останньому розділі роботи.

Регуляція біосинтезу РФ, ФМН та ФАД відбувається не лише на рівні експресії структурних генів та каталітичної активності відповідних ферментів, але контролюється цілим рядом уже відомих та можливих потенційно нових, не знайдених на даний час, регуляторних факторів. Вивчення механізмів регуляції біосинтезу флавінів має важливе фундаментальне та практичне значення.

1.3. Регуляція біосинтезу рибофлавіну

1.3.1. Регуляція біосинтезу рибофлавіну в бактерій

До надсинтезу РФ здатні декілька видів бактерій (Табл. 1.1). У більшості випадків причини виникнення надсинтезу РФ невідомі. Найбільш детально регуляція біосинтезу РФ вивчена у бактерій *B. subtilis*. Як згадувалось вище, структурні гени біосинтезу РФ у *B. subtilis* формують оперон, регуляція якого забезпечується активністю генів *ribC* (РФ-кіназа/ФАД-синтетаза), *ribR* (РФ-кіназа) та локусом *ribO*. Оскільки надсинтез ФМН інгібує біосинтез РФ, інактивація генів РФ-кінази, очікувано, призводить до підвищення рівня синтезу та продукції РФ. Також встановлено, що область *ribO* є цис-діючим елементом і виступає в ролі оператора негативної регуляції транскрипції цього оперону (Bresler et al., 1972; Perumov, 1980; Mironov, 1989).

У зв'язку із виявленою високою консервативністю нуклеотидних послідовностей операторів генів біосинтезу РФ у різних типів бактерій, цей генетичний елемент назвали RFN-елемент. Він формує 5-шпильчасту структуру, конформаційні зміни якої регулюють функціонування цього

оперону за типом атенуації - передчасної термінації транскрипції (Gelfand et al., 1999; Vitreschak et al., 2002; Mironov et al., 2002).

Перші дослідження біосинтезу РФ у *E. coli* були проведені у 1962 році (Wilson and Pardee, 1962). Більш детальне вивчення процесів регуляції синтезу цього флавіну в *E. coli* було проведено у лабораторії проф. Г. М. Шавловського у Львові з використанням ауксотрофних мутантів *E. coli*. Було встановлено, що синтез РФ відбувається конститутивно і не регулюється шляхом зміни синтезу ферментів (Shavlovskiy et al., 1982; Тесляр та ін., 1983).

1.3.2. Регуляція біосинтезу рибофлавіну в дріжджів

Описано цілий ряд регуляторних чинників, які залучені у контроль флавіногенезу в дріжджів. Ці дані узагальнено головню в оглядах: Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006 та Abbas and Sibirny, 2011. Експериментальним шляхом було виявлено декілька видів дріжджів, що здатні синтезувати РФ за умов дефіциту іонів Феруму у середовищі: *P. guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida albicans*, *Candida robusta*, *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *D. subglobosus* та *Schwanniomyces occidentalis*. Була встановлена позитивна кореляція рівня флавіногенної активності дріжджів із швидкістю поглинання Феруму клітинами. Хоча ефект активації флавіногенезу за умов низьких концентрацій Феруму був відкритий ще у 1945 році (Tenner et al., 1945), детальні механізми цієї регуляції все ще залишаються невідомими.

Вперше, використання дріжджів *P. guilliermondii* як експериментальної моделі для дослідження механізмів регуляції біосинтезу РФ було започатковано проф. Шавловським Г. М. на кафедрі мікробіології, Львівського державного університету імені Івана Франка та продовжено у Львівському відділенні інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (тепер Інститут біології клітини НАН України). Було показано, що високий вміст іонів Феруму в середовищі не спричиняє руйнування утвореного РФ але пригнічує процес його

біосинтезу. Також, встановлено, що у *P. guilliermondii* дефіцит Феруму призводить до зростання активності всіх ферментів флавіногенезу, окрім редуктази. Методом класичного мутагенезу було одержано декілька типів мутантів (*rib80 rib81, hit1, red6*), здатних до надсинтезу РФ за умов оптимального вмісту Феруму, та мутант *rib83*, який, навпаки, нездатний надпродукувати вітамін В₂ за дефіциту цього іону в середовищі. Наявність мутацій у виділених штаммах *rib80, rib81, hit1* і *red6* спричиняла зменшення рівня репресії ферумом транскрипції генів флавіногенезу, підвищення швидкості поглинання Феруму та вмісту цього металу в клітинах (Shavlovskiy et al., 1973; Сибирный, 1985; Shavlovskiy et al., 1985; Shavlovskiy et al., 1988; Шавловский и др., 1993).

У 1985 р. вперше було продемонстровано, що мутація *rib80* призводить до більше ніж 10-ти кратного підвищення синтезу РФ *P. guilliermondii* за оптимального для росту вмісту Феруму в середовищі вирощування. Детальний аналіз продемонстрував значне збільшення активності ГТФ-циклогідролази-II і ДМРЛ-синтази та підвищення концентрації іонів Феруму в клітинах мутантів *rib80* в декілька разів. Також спостерігали збільшення активності РФ-синтази, але не РФ-кінази. Детально було досліджено здатність до поглинання Fe⁵⁵ штаму дикого типу та мутантів *rib80*. Показано, що поглинання Феруму є активним транспортним процесом (Shavlovskiy et al., 1985; Shavlovskiy et al., 1988; Shavlovskiy et al., 1989; Шавловский и др., 1993).

Наступним етапом аналізу механізмів регуляції флавіногенезу було одержання мутантів *rib81*. Для виділення цих мутантів було використано два методи. Перший з них полягав у відборі штамів, резистентних до аналога РФ - 7-метил-8-хлор-10-(1'-D-рибітил)ізоалоксазин у (МТРІ), а другий - ґрунтувався на селекції температурозалежних мутантів. Ці мутанти характеризувались значно вищим рівнем біосинтезу РФ, ніж мутанти *rib80*, підвищеною активністю ГТФ-циклогідролази, РФ-синтази, швидкістю поглинання іонів Феруму та здатністю до його виділення в середовище.

Поєднання обох мутацій *rib80* та *rib81* призводило до значного підвищення продукції РФ, порівняно із кожним мутантом окремо, що вказує на синергічну взаємодію цих мутацій (Shavlovskiy et al., 1985; Шавловський и др., 1993; Бабяк та ін., 2001).

Використання природнього мутанта 1453 та одержаного мутанта *rib83*, дозволило виявити втрату здатності до надпродукції РФ за умов дефіциту Феруму і дисфункції цих генетичних елементів. У процесі аналізу активності ключових ферментів флавіногенезу - ГТФ-циклогідролази II, РФ-синтаза виявляла однакову каталітичну активність цих ензимів як за умов дефіциту, так і за достатньої концентрації іонів Феруму в середовищі. У цьому випадку мутація *rib83* епістатувала над мутаціями *rib80* і *rib81*. Штами, що містили мутації негативного типу дії разом з мутацією *rib83* були не здатними до надсинтезу РФ не тільки за оптимального для росту вмісту Феруму в середовищі, а й за умов його дефіциту (Shavlovskiy et al., 1985; Shavlovskiy et al., 1989; Stenchuk et al., 2001).

Делеція гена *YFH1* *P. guilliermondii*, що кодує гомолог фратаксину - еукаріотичного мітохондріального білка, спричиняє до суттєвого збільшення надпродукції РФ та накопичення Феруму в клітинах. Одержані мутанти *Dyfh1* виявляли підвищену чутливість до пероксиду водню, екзогенного РФ та зміну активності супероксиддисмутази. Отримані дані свідчать про те, що активатор транскрипції *Uap1p* також залучений у регуляцію біосинтезу РФ та процес накопичення Феруму у клітинах *P. guilliermondii* (Babcock et al., 1997; Santos et al., 2004; Руняха et al., 2009).

Методом інсерційного мутагенезу було сконструйовано мутанти із делецією гомолога гена *YMA1* (кодує вакуолярну АТФазу) *A. gossypii* (Foster et al., 1999) та *FRA1* (ген потенційної амінопептидази) *S. cerevisiae* (Milgrom et al., 2007; Kumanovics et al., 2008). Мутант *Dvma1-17* *P. guilliermondii* продукував у 5-7 разів більше РФ та накопичував вдвічі менше Феруму в клітинах порівняно з батьківським штамом. У делеційного мутанта *Dfra1-45* *P. guilliermondii* також

виявлено збільшення синтезу цього вітаміну в декілька разів та вмісту Феруму в 2 рази порівняно з контролем (Boretsky et al., 2011).

Цікавою є наявність можливої стимулюючої дії на флавіногенез казеїнкінази, оскільки делеція фрагменту геномної ДНК, що містить ген із високою гомологією до гена *СКА2* (кодує субодиницю казеїнкінази) спричиняє пригнічення флавіногенезу (Dmytruk et al., 2006). Забезпечення надекспресії цього гена у дріжджів, може відкрити нові шляхи підвищення виходу РФ за використання як культуральних середовищ побічних продуктів молочної промисловості.

Особливої уваги заслуговують дослідження механізмів регуляції флавіногенезу у *C. famata*, оскільки штами-надсинтетики цих дріжджів уже використовувалися для промислового одержання РФ. Було проведено секвенування та клонування основних структурних та регуляторних генів біосинтезу РФ, ФМН та ФАД (Dmytruk et al., 2004). Шляхом детального аналізу встановлено, що промоторні ділянки гена *RIB1*, а також генів *RIB6* і *RIB7* містять потенційні сайти впізнавання регуляторами транскрипції Aft1 та Fer1p (відповідно), які у свою чергу, є відомими регуляторами транспорту Феруму у *S. cerevisiae* та *Schizosaccharomyces pombe* (відповідно) (Voronovsky et al., 2004). Важливим регуляторним елементом біосинтезу РФ у дріжджів є ген *SEF1*, що кодує один із центральних регуляторних факторів транскрипції генів флавіногенезу (Dmytruk et al., 2006; Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2014). Пошкодження цього гену призводить до втрати здатності надсинтезувати РФ за умов нестачі іонів Феруму. Введення додаткової копії цього гена, навпаки не тільки стимулює надсинтез РФ у дріжджів *C. famata*, а й підвищує стабільність штамів-надсинтетиків. Введення додаткових копій структурних генів *C. famata* *RIB1* та *RIB7* забезпечили ще більше зростання продукції РФ рекомбінантними штамми-надсинтетиками РФ (Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2014).

Цікаві дані, щодо ролі генів *SEF1*, *SFUI* та *VMA1* у регуляції флавіногенезу одержані на основі створених делеційних («D» - deletion) штамів

Dsef1, *Dsfu1*, та *Dvma1* *C. famata* відповідно (Andreieva et al., 2020). Було показано, що делеція гену *SEF1* призводить до суттєвого зниження рівня продукції флавінів, тоді як повторне введення цього гену в геном делеційних мутантів забезпечує відновлення надсинтезу РФ. Ген *SFU1*, що кодує фактор транскрипції родини GATA у патогенних флавіногенних дріжджів *C. albicans* запобігає токсичній дії високих концентрацій Феруму в середовищі та інгібує *SEF1*. Встановлена пряма взаємодія білкових продуктів Sfu1 і Sef1 із подальшим транспортом цього комплексу в цитоплазму, та як наслідок, інактивацією останнього. Як і очікувалось,штами із делецією гена *SFU1* характеризувались підвищеним синтезом РФ (Chen et al., 2011). Делеція дріжджового аналога *VMA1* *A. gossypii* також спричинило збільшення виходу РФ у мутантів *Dvma1* *C. famata* (Andreieva et al., 2020).

Повертаючись до ролі іонів металів у регуляції флавіногенезу, слід наголосити, що крім Феруму, регуляторними властивостями володіє і цілий ряд іонів інших металів. Для прикладу, іони Co(II) спричинило суттєву активацію синтезу РФ. Іони Cd(II) призводили до появи великої кількості блакитно флюоресціюючої речовини, найвірогідніше, проміжної сполуки шляху синтезу РФ. В обох випадках спостерігали накопичення значної кількості Феруму в клітині, що спростовує припущення щодо індукованого цими іонами можливого дефіциту Феруму (Enary et al., 1955; Shavlovskiy et al., 1958). Іони Zn(II) та Mn(II) також підвищують рівень синтезу РФ у дріжджів (Knusel et al., 1957; Прокопів та ін., 2003). Значно більший вплив на продукцію РФ мають іони Cr(VI) (Fedorovych et al., 2001).

Слід зауважити, що дефіцит Феруму призводить до зменшення рівня 6- атомних вуглеводів та накопиченню пентоз у клітині, що обумовлене активацією пентозофосфатного циклу. Підвищення вмісту пентоз, має важливе значення у забезпеченні процесу флавіногенезу необхідними субстратами - попередниками РФ (Schwechheimer et al., 2016). У більшості флавіногенних мікроорганізмів, збільшення концентрації пуринів, викликає підвищення

виходу РФ (Schwechheimer et al., 2016; Dmytruk et al., 2020). Причому ефект стимуляції, залежить від конкретного штаму над синтетиків.

Для прикладу синтез РФ у дріжджів *C. goshii* стимулює аденін, тоді як гуанін/ксантин активує флавіногенез у *C. flareri*. ГТФ є безпосереднім попередником синтезу РФ. Надекспресія модифікованих генів біосинтезу пуринів *PRS3* (кодує ген ферменту - фосфорибозилпірофосфатсинтетази) і *ADE4* (кодує ген ферменту - фосфорибозилпірофосфатамінотрансферази) *D. hansenii* у раніше сконструйованому штамі надсинтетику РФ *C. famata*, викликала 2-х кратне збільшення продукції РФ одержаними трансформантами (Dmytruk et al., 2020). Попередник синтезу пуринів - гліцин, у дріжджів спричиняє зростання утворення ФАД. Значним впливом на активацію біосинтезу РФ володіють й інші фактори.

Виявлено різке зниження рівня синтезу РФ у разі використання як субстрату дульцину, трегалози і целобіози. Як джерела Нітрогену флавіногенні дріжджі використовують сечовину, а також аспарагін, амоній сульфат, гліцин, метіонін та інші амінокислоти (Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006). Регуляція флавіногенезу також відбувається кінцевими продуктами цього метаболічного шляху. Для прикладу було показано, що РФ інгібує активність ДМРЛ-синтази, тоді як ФАД пригнічує каталітичну активність ГТФ-циклогідролази II. Проте зростання вмісту цих двох метаболітів не впливає на активність РФ-синтази (Logvinenko et al., 1973; Shavlovskiy et al., 1978; Logvinenko et al., 1989).

Цікавими є результати досліджень, щодо активації надсинтезу РФ у відповідь на дію метилвіологену (МВ), що є індуктором оксидативного стресу. Обробка МВ призводить до зростання рівня оксидативного стресу і підвищення продукції РФ (Protchenko et al., 2000). За дії цього агента підвищується рівень малонового діальдегіду, одного із маркерів оксидативного стресу у клітині. Виявлено, що за умов нестачі Феруму клітини *P. guilliermondii* збільшують продукцію РФ, вміст малонового діальдегіду та карбонільних груп білків, що

відображає збільшення внутрішньоклітинного вмісту реактивних форм кисню. Також було виявлено різке зниження активності каталази і супероксиддисмутази у *P. guilliermondii* за дефіциту Феруму в середовищі (Protchenko et al., 1999; Prokopiv et al., 2013).

Мутанти - надсинтетики РФ (*rib80*, *rib81* і *hit1*) характеризувалися схожим зниженням активності згаданих ферментів (Shavlovskiy et al., 1980; Shavlovskiy et al., 1985; Шавловский и др., 1993; Бабяк та ін., 2001; Fedorovich et al., 2000). Крім дефіциту Феруму, високі концентрації іонів Co(II) також провокують оксидативний стрес у *P. guilliermondii* та підвищення продукції РФ і вмісту Феруму в клітинах. Виявлено, що високий вміст Co(II) у середовищі призводить також до збільшення кількості мітохондрій. Одержані дані підтверджують існування зв'язку між регуляцію флавіногенезу, асиміляцією Феруму та оксидативним стресом у клітині. Більш висока чутливість до дії індукторів оксидативного стресу, таких як менадіон, пероксид водню та деяких солей слугує додатковим підтвердженням цієї гіпотези. Автори припустили, що надсинтез РФ у клітині можливо, запускається саме оксидативним стресом, шляхом зміни регуляції функціонування структурних та регуляторних генів біосинтезу РФ (Protchenko et al., 1999; Prokopiv et al., 2013). Проте, для кращого розуміння механізмів регуляції флавіногенезу необхідні подальші дослідження.

1.3.3. Регуляція біосинтезу рибофлавіну в міцеліальних грибів

Регуляція флавіногенезу у міцеліальних грибів описана в ряді оглядів: Averianova et al., 2020; Ledesma-Amaro, 2016; Aguiar et al., 2015. Синтез РФ досліджений головню на двох видах міцеліальних грибів – *E. ashbyii* і *A. gossypii*. Особливо детально вивчена система регуляції флавіногенезу в міцеліального гриба *A. gossypii*, який на даний час також активно використовують у промисловому виробництві РФ. Загалом, процес біосинтезу РФ схожий з таким у бактерій та дріжджів, проте пов'язана із життєвим циклом

цих мікроорганізмів. Характерною особливістю для *E. ashbyii* є високий рівень продукції не лише РФ але і ФАД (Shavlovskiy et al., 1984; Ozbas et al., 1992). Було встановлено, що активація флавіногенезу відбувається за умови зниження активності міцелійного росту у стаціонарній фазі та початку процесу спороутворення. Ці спостереження чітко корелювали із суттєвою активацією основних ферментів біосинтезу флавінів - ГТФ-циклогідролази, РФ-кінази та ФАД-синтази. Це дозволяє припустити, що синтез РФ може використовуватись як захисний механізм для виживання спор (Stahmann et al., 2001). Мутанти із втратою здатності до спороутворення, характеризувалися значним зниженням активності флавіногенезу. У гриба *A. gossypii* надсинтез РФ виявився найактивнішим за температури вирощування 26-28° С. За підвищення температури відбувається пригнічення цього процесу (Stahmann et al., 2001; Nakajima and Minematsu, 2004).

Крім цього, продукція РФ флавіногенним грибом *A. gossypii* лімітується постачанням попередників біосинтезу цього вітаміну (Koltun et al., 1984; Kaesler et al., 1996; Monschau et al., 1998; Förster et al., 1999; Ledesma-Amaro et al., 2015). Встановлено, що надекспресія гену *AgADE4*, який кодує фосфорибозилпірофосфат аміотрансферазу (ФРПАТ) із заміною за допомогою сайт-специфічного мутагенезу відповідних амінокислотних залишків, які є важливими для регуляції активності цього ферменту шляхом ретроінгібування, приводила до посилення потоку метаболітів через пуриновий шлях і, відповідно, до 10-кратного (228 мг/л) зростання продукції РФ у мутантного штаму (Jiménez et al., 2005). Показано, що часткове зростання активності фосфорибозилпірофосфатсинтетази (ФРПС) також призводить до посилення надпродукції РФ в *A. gossypii* (Jiménez et al., 2008). Аналіз пошкодженого локусу ДНК мутантного штаму виявив інактивацію гомолога гену *BAS1* *S. cerevisiae*, який належить до родини транскрипційних факторів Myb. AgBAS1 є важливим транскрипційним фактором, що контролює ріст і є залученим у регуляцію біосинтезу пуринів, гліцину та РФ. За допомогою повної або

часткової делеції гену *AgBAS1* підтверджено, що інактивація *BAS1* в *A. gossypii* призводить до надсинтезу РФ (Mateos et al., 2006). Основна кількість РФ у *A. gossypii* накопичується у вакуолях клітин міцелію та утримується завдяки дії вакуолярної АТФ-фази (кодується геном *IMA1*) (Förster et al., 1999). Пошкодження цього гена забезпечило активний викид РФ у культуральне середовище і відкрило можливість для використання цього мікроорганізму в промисловому виробництві РФ. На даний момент, усі гени флавіногенезу *A. gossypii* секвеновані, що дозволяє надалі проводити удосконалення цього штаму-надсинтетика РФ.

1.4. Система транспорту флавінів у дріжджів

Більшість мікроорганізмів здатні забезпечувати свої потреби у вітаміні В₂ завдяки існуванню власного внутрішньоклітинного синтезу РФ. Наявність транспортних систем РФ в організмах, не здатних до його ендогенного синтезу (молочнокислі бактерії, ссавці) забезпечує надходження і наступні метаболічні перетворення РФ всередині клітин у його біологічно активні форми - ФМН і ФАД. Крім цього, у ссавців виявлено наявність специфічних транспортних білків і їх структурних генів, що активуються саме в період лактації для забезпечення екскреції РФ клітинами молочної залози у грудне молоко (див. нижче). Крім процесів транспорту РФ у бактерій *B. subtilis* (Bresler et al., 1972), міцеліального гриба *A. gossypii* (Förster et al., 1999; Förster et al., 2001), даний процес досліджували в *S.cerevisiae* (Perl et al., 1976; Stoelz et al., 2004) та флавіногенних дріжджів *P. guilliermondii* (Liesegang et al., 1971; ; Сибирный и др., 1977а/б/в; Sibirny et al., 1984; Straube et al., 1984). Встановлено неспроможність ряду природних і РФ- залежних (РФ- ауксотрофних) штамів (*H. polymorpha*, *C. famata*, *Pichia ohmeri*, *Pichia methanolica*) до транспортування РФ із середовища та його акумуляції в клітинах у значних кількостях. Винятком є дріжджі *P. guilliermondii*, що проявляють активність специфічних транспортних систем РФ за певних умов. Шляхом аналізу

одержаних РФ- ауксотрофних мутантів, здатних рости за дуже низьких концентрацій РФ у середовищі, виявлено наявність двох різних транспортних білків – РФ-пермеази I і РФ-пермеази II, гени яких вважаються криптичними (сплячими) (Сибирный и др., 1977а/б/в; Sibirny et al., 1984; Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006; Abbas and Sibirny, 2011).

1.4.1. РФ-пермеази I і II

Дикий штам флавіногенних дріжджів *P. guilliermondii* нездатний поглинати РФ із середовища. Методом мутагенезу, було отримано РФ-ауксотрофні штами, що могли рости лише за наявності надвисоких концентрацій цього вітаміну в середовищі (200 мг/л). Далі, використовуючи один із цих ауксотрофів - *rib2* виділено декілька мутантів, здатних рости за набагато нижчої концентрації РФ (2 мг/мл). Шляхом наступної селекції, з них виділили мутанти із ще менш вираженою необхідністю в екзогенному РФ (0,1 мг/л). Один із мутантів (одержав назву MS1-3) набував яскраво-жовтого забарвлення колоній за вирощування на твердому агаризованому середовищі із високим вмістом РФ (200 мг/л). Аналіз колоній виявив високий вміст кристалів РФ (20 мг/г сухої маси клітин), локалізованих у вакуолях.

Транспортний білок проявляв високу субстратну специфічність до РФ, не транспортував ФМН і ФАД та пригнічувався інгібіторами енергетичного обміну. Глюкоза також пригнічувала активність цього білка, але не транспортувалась цим транспортером у клітину. Крім глюкози, інгібування викликали інші цукри: сахароза, мальтоза, трегалоза, 2-дезоксиглюкоза та α -метилглюкозид. Фруктоза і манноза не виявляли супресорної дії. Цей транспортний білок (одержав назву- РФ-пермеаза I) утворювався в клітинах *P. guilliermondii* лише за умов вирощування в середовищі з α -глюкозидами (сахароза, мальтоза, α -метилглюкозид), але не в середовищах із глюкозою чи фруктозою (Shavlovsky et al., 1977; Sibirny et al., 1984).

Наступна селекція мутантів із використанням структурного аналога РФ - 8-піперидил-10-(1'-D-рибітил)-ізоалоксазину, дозволила виявити колонії з вищою афінною специфічністю РФ-пермеази до РФ. Подальший мутагенез, привів до появи мутантів із конститутивним синтезом цього транспортного білка у клітинах, вирощених на глюкозо-вмісних середовищах та стійких до супресорної дії глюкози (Сибирный и др., 1978; Sibirny et al., 1984).

Схожим шляхом, із ауксотрофного мутанту *P. guilliermondii rib3*, було селекціоновано мутант RA68-2, який здатний до росту за дуже низьких концентрацій РФ та поглинав великі кількості цього вітаміну при перенесенні на середовище із високим вмістом РФ. Він також накопичував РФ в вакуолях у вигляді кристалів. Швидкість акумулювання РФ мутантами MS1-3, була на порядок вища в порівнянні із RA68-2. Проте при вирощуванні на глюкозо/сахарозо-вмісних середовищах, активності поглинання цього вітаміну були схожими, що засвідчило резистентність транспортної системи мутанта RA68-2 до цих джерел Карбону. Беручи до уваги ці результати, було запропоновано існування двох типів транспортних білків РФ - РФ-пермеази I (мутанти MS1-3) та РФ-пермеази II (мутанти RA68-2). Гени, даних білків не є зчепленими (Сибирный и др., 1977; Shavlovsky et al., 1977; Sibirny et al., 1984; Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006).

Дикі штами *S. cerevisiae* не здатні до поглинання помітних кількостей РФ. Водночас рибофлавін-залежні мутанти *S. cerevisiae* виявляли здатність до транспорту цього вітаміну. Основна частина поглинутого РФ нагромаджувалась в клітинах у незмінній формі. Найвищу транспортну активність виявляли клітини з експоненційної фази росту в анаеробних умовах. Транспорт РФ виявився температуро- і рН-залежним процесом, що характеризувався кінетикою з насиченням ($K_m = 15 \mu M$) (Perl et al., 1976). У 2005 році німецькі автори описали клонування гена *MCH5 S. cerevisiae YOR306C* (гомолог монокарбоксилаттранспортера теплокровних), який виявився транспортером РФ. Цей висновок базувався на здатності

висококопійних плазмід, що несли цей ген, комплементувати ріст ауксотрофів за РФ при низьких концентраціях цього вітаміну в середовищі. У той же час, ауксотрофи за РФ, у котрих цей ген делетували, відновлювали свій ріст тільки при збільшенні концентрації РФ у середовищі на порядок. Гіперекспресія інших генів, що кодують білки цієї ж родини МСН ніяк не впливала на ріст ауксотрофів за РФ (Reihl and Stolz, 2005).

1.4.2. РФ-екскретаза

Як зазначалося вище, широко вживані підходи конструювання продуцентів РФ засновані переважно на надекспресії генів, що беруть участь у біосинтезі РФ та його пуринового попередника. Однак, давно встановлено, що більш ефективно виведення надлишку виробленого метаболіту може стимулювати його загальне утворення. Перші класичні дані були отримані в результаті спостереження, щодо здатності ауксотрофів за біотином *Corynebacterium glutamicum* із посиленою опосередкованою екскрецією внутрішньоклітинних метаболітів накопичувати підвищену кількість глутамінової кислоти (Kinoshita et al., 1972; Gutmann et al., 1992). Надекспресія генів, що кодують білки специфічних транспортних систем, активує загальну продукцію метаболітів у бактерій (Jones et al., 2015). На дріжджах цей підхід використовувався, наскільки нам відомо, лише один раз, оскільки наразі в цих організмах було виявлено дуже мало таких систем виділення. Встановлено, що надекспресія гена, що кодує білок транспортної системи глутатіону людини у дріжджах *S. cerevisiae* збільшує продукцію цього трипептиду (Kiriya et al., 2012).

Транспорт РФ дотепер не привертав особливої уваги у біотехнологічному виробництві РФ. Була проведена надекспресія гена *RibM* транспортної системи бактерії *Streptomyces davaonensis* у штамі-надсинтетику РФ *B. subtilis*, що привело до незначного підвищення продукції цього вітаміну. (Hemberger et al., 2011). Є дві публікації, щодо екскреції РФ в дріжджів *S. cerevisiae* (Perl et al.,

1976) і флавіногенних дріжджів *P. guilliermondii* (Сибирный и др., 1977б). До цього часу в мікроорганізмів не було виявлено жодного гена, що кодує РФ-екскретазу.

Підтвердженням функціонування двох протилежних систем транспорту РФ-пермеазної та екскретазної, було одержано шляхом аналізу мутантів *P. guilliermondii* із порушеною екскретазною активністю (Shavlovsky et al., 1977; Сибирный и др., 1981; Sibirny et al., 1984). Активація регуляторних генів флавіногенезу в цих мутантах, приводила до надсинтезу і накопичення РФ у клітинних вакуолях у вигляді кристалів та практично повної відсутності екскреції цього вітаміну в культуральне середовище. Оскільки РФ-пермеазна активність в клітин зберігалась і накопичення РФ могло бути пояснене активним поглинанням цього вітаміну із середовища, були одержані нові мутанти, стійкі до дії аналога РФ – 7- метил- 8- хлор- 10- (1- рибітил) ізоалоксазину, із порушеною активністю як РФ-пермеаз так і РФ-екскретази. Отримані мутанти також накопичували високі кількості РФ у клітині та не виділяли його в культуральне середовище, що підтвердило наявність функціонування РФ-екскретазної системи для ефективного виділення РФ у середовище. Дія РФ-екскретази характеризується субстратною специфічністю. Структурний аналог РФ, 8-піперидил- 10- (1- D- рибітил) ізоалоксазин конкурує з РФ як субстратом для РФ-пермеазної активності але повністю блокує дію РФ-екскретази. Крім цього, різні джерела Карбону по різному впливають на активності РФ-пермеази та РФ-екскретази, що ще раз підтверджує існування двох різних систем транспорту РФ - у клітину та із клітини, відповідно. Слід зазначити, що на відміну від РФ-пермеаз, гени яких є криптичними, РФ-екскретаза активна і у дикого штаму *P. guilliermondii*, оскільки за дефіциту Феруму, синтезований РФ виділяється у середовище (Сибирный и др., 1981; Sibirny et al., 1984; Сибирный, 1985).

В іншого модельного об'єкта - РФ-ауксотрофного штаму гриба *A. gossypii* (*rib5*), також виявлені системи поглинання та екскреції РФ, хоча із значно

нижчою активністю. Оскільки акумуляція РФ в міцелії цих клітин відбувалась у вакуолях, було зроблене припущення, що цей процес регулюється вакуолярною АТФ-азою. Делеція відповідного гена (*VMAL1*), привела до блокування внутрішньоклітинного накопичення РФ із його наступним надактивним викидом у культуральне середовище. Одержаний феномен, разом із іншими генетичними маніпуляціями забезпечили формування бази для створення сучасного промислового надпродуцента РФ на основі гриба *A. gossypii* (Förster et al., 1999; Förster et al. 2001). Тому, вивчення систем транспорту РФ а також механізмів їх регуляції є одним із ключових способів підвищити продуктивність уже існуючих та потенційно нових промислових надсинтетиків цього вітаміну.

Детально проаналізовано та описано ген *BCRP1*, білковий продукт якого забезпечує виділення РФ у молоко клітинами молочної залози ссавців (Herwaarden et al., 2007). Також виявлено безпосередню участь цього білка в формуванні множинної стійкості ракових клітин ссавців до дії протипухлинних препаратів. Аналізуючи лінію клітин раку молочної залози людини (MCF-7yAdrVp), що демонструвала стійкість до антрацикліну, виявлено надекспресію гена транспортного білка родини ABC (ATP-binding cassette), тоді як більшість генів відомих транспортерів родини MDR (multidrug resistance), що власне забезпечують резистентність до протипухлинних сполук, були неактивними. Надекспресія цього гена, також приводила до набуття пухлинними клітинами стійкості до доксорубіцину, мітоксантрону та підвищувала екскрецію родаміну, що висвітлено у чисельних публікаціях: Merino et al., 2006; Mao et al., 2015; Bircsak and Aleksunes, 2015; Mehendale-Munj and Sawant, 2021.

Подальші дослідження встановили, що за фізіологічної норми, білок BCRP забезпечує екскрецію РФ клітинами молочної залози в молоко у період лактації. Для прикладу, в мишей із делецією гена *BCRP1*, концентрація РФ в молоці знижувалась у 60 разів, порівняно з контролем (Herwaarden et al., 2007, Merino et al., 2010). Відомо про успішно проведену функціональну надекспресію

людського гена *BCRPI* у дріжджах *P. pastoris*, що дозволило налагодити промислове виробництво білка BCRPr (Mao et al., 2004) у медичних цілях.

Оскільки білок BCRP забезпечує активну секрецію РФ в молоко, ми припустили, що його дріжджовий гомолог може відповідати за екскрецію РФ з клітин дріжджів і, відповідно, надекспресія його гена може призвести до підвищення продукції РФ штамми-надсинтетиками РФ *S. famata*. Конструювання дріжджових надсинтетиків РФ із підвищеною активністю екскреції цільового продукту відкриває нові перспективи для їх покращення.

1.5. Основні підходи до конструювання промислових надсинтетиків рибофлавіну

Виробництво РФ шляхом мікробіологічного синтезу є основним способом одержання цього вітаміну у промислових масштабах. Основні біотехнологічні процеси виробництва РФ із використанням рекомбінантних штамів мікроорганізмів описані у ряді праць: Stahmann et al., 2000; Kato and Park, 2012; Aguiar et al., 2015; Averianova et al., 2020; Wang et al., 2021; Zhang et al., 2021; You et al., 2021; Liu et al., 2023. Перше виробництво РФ розпочалося перед другою світовою війною із використанням як продуцента, бактерії *Clostridium acetobutylicum*, потім було використано міцеліальні гриби *E. ashbyii* і *A. gossypii*. Далі, провідну роль на себе взяв хімічний синтез, оскільки на той час був більш рентабельним. До недоліків хімічного синтезу РФ слід віднести багатоетапність, наявність проміжних метаболітів у кінцевому продукті, забруднення навколишнього середовища. Проте, із 70-х років і по сьогодні, мікробний синтез РФ повернув своє лідерство і захопив практично весь ринок виробництва цього вітаміну (Stahmann et al., 2000). Використовуючи методи класичного мутагенезу та генної інженерії, було сконструйовано декілька високопродуктивних надсинтетиків РФ на основі бактерій *B. subtilis*, гриба *A. gossypii* та дріжджів *S. famata* із виходом РФ близько 15-30 г/л., що

забезпечило відновлення рентабельності виробництва з використанням мікроорганізмів. Як вже згадувалось, на даний час основні обсяги виробництва РФ налагоджені компаніями BASF, DSM та Hubei Guangji Pharmaceutical (також, до недавня Archer Daniels Midland) із фінансовою часткою на ринку близько 400 мільйонів американських доларів та в кількостях до 12 тис. тонн РФ на рік (*Riboflavin Market – Grows, Trends, COVID-19 Impact, And Forecasts (2022-2027)*, 2022). Превагами мікробного синтезу цього вітаміну є використання дешевих культуральних середовищ, відсутність шкідливих побічних метаболітів та суттєве енергозбереження (Stahmann et al., 2000; Zu Berstenhorst et al., 2009; Belenky et al., 2011; Eggersdorfer et al., 2012).

Кожен із створених надпродуцентів має свої переваги та недоліки (Stahmann et al., 2000). Бактерійний штам *B. subtilis* характеризуються високою стабільністю, швидкими темпами росту та високим виходом РФ на одиницю спожитого карбонового субстрату. Проте, бактеріальні штами вразливі до фагових інфекцій та лізису. Штам гриба *A. gossypii*, забезпечує активний синтез РФ на відходах харчової промисловості, однак його ріст (трофічна фаза) відносно повільний та відбувається на поверхні твердих середовищ, що ускладнює технологію виробництва (Stahmann et al., 2000; Averianova et al., 2020; You et al., 2021). Дріжджі *S. famata* є зручними об'єктами, оскільки здатні активно рости у рідких середовищах (в т. ч. на відходах харчової промисловості) та відносно невибагливі до умов вирощування. Крім РФ, одержана дріжджова біомаса є цінною вітамінною та білковою кормовою добавкою. Промисловий штам *S. famata* der8, що використовувався в минулому, характеризувався низькою генетичною стабільністю. На сьогоднішній день, одержано нові стабільні штами AF-4 і BRP *S. famata*, проте вони потребують подальшого удосконалення в зв'язку з низьким виходом РФ на одиницю спожитого Карбону в порівнянні з іншими існуючими продуцентами (Dmytruk et al., 2011; Averianova et al., 2020; Wang et al., 2021).

Створення надпродуцентів РФ здійснювалось із використанням кількості етапного мутагенезу та генетичної модифікації структурних і регуляторних генів. Процес мутагенезу *B. subtilis* проводився шляхом селекції стійких клонів до різних антиметаболітів - структурних аналогів РФ, РоФ, пуринових аналогів, таких як 8-азагуанін, тіогуанін, 8- азаксантин, а також декоїнін та антагоніста глутаміну - сульфоксиду метіоніну та ін. Методами генної інженерії було внесено цілий ряд змін у активності структурних і регуляторних генів флавіногенезу. Генетичне конструювання продуцентів *B. subtilis* проводилось шляхом введення та надекспресії додаткових копій *RIB* оперону. Крім цього, надекспресовано гени пентозофосфатного шляху та пуринового синтезу, що забезпечило підвищення утворення метаболічних попередників РФ. Досягнуто високих рівнів транскрипції структурного гена (*ribA*) та *PurR*-регульованих генів, для збільшення в клітині рівня фосфорибозилпірофосфату (ФРП) (Perumov, 1980; Mironov, 1989; Sauer et al., 1997; Perkins et al., 1999; You et al., 2022).

Початкова селекція продуцентів РФ гриба *A. gossypii* проводилась із використанням ітаконату, оксалату та інгібіторів ізоцитратліази (Schmidt et al., 1996ab; Maeting et al., 1999). Оскільки ці гриби, за наявності глюкози, синтезують етиловий спирт і накопичують ліпіди та лише при повному використанні глюкози починають перетворювати ліпіди у РФ (Goodsman and Ferrera, 1954; Smith et al., 1961, Szczesniak et al., 1971a; Szczesniak et al., 1971b), основним напрямком генетичної інженерії було досягнення підвищених кількостей гліцину, що слугує попередником синтезу пуринових нуклеотидів. Для цього, було одержано штами із надекспресією гена, що кодує фермент біосинтезу гліцину - треонінальдолазу та пошкоджено ген *SHM2*, (кодує серинову гідроксиметилтрансферазу) для зменшення перетворення гліцину до серину (Schlüpen et al., 2003; Mateos et al., 2006). Додатково, надекспресовано ген аланін-гліюксилатамінотрансферази, що активує синтез гліцину з гліюксилату, модифіковано активність генів, залучених у синтез пуринів і

гліцину шляхом делеції С-кінцевої ділянки гена *AgBAS1* (кодує транскрипційний фактор), та активовано шлях пуринового метаболізму за допомогою модифікації генів (запобігання інгібуванню активності кінцевими продуктами) ферментів - ФРП-амідотрансферази і ФРП-синтетази (Mateos et al., 2006; Kato and Park, 2012). Також модифікували гени залучені у цикл гліюксилатів та поглинання жирних кислот. Як вже згадувалось, делеція гена *IMA1* вакуолярної АТФ-ази привела до активної екскреції РФ із вакуоль клітин міцелію в середовище (Förster et al., 1999).

Перший надсинтетик РФ на основі дріжджів *C. famata* був створений методом класичного багатоетапного мутагенезу дикого штаму NRRL Y245 та названий der8 (патент ATCC 20849) (Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006; Abbas and Sibirny, 2011). Він активно використовувався в промисловому виробництві РФ компанією ADM (США), проте, через низьку стабільність штамів та нерентабельність дане виробництво було зупинене (Abbas and Sibirny, 2011). Розробка та впровадження нових методів генної інженерії, що не були відомі на час створення der8, відкривають нові можливості використання високого флавіногенного потенціалу дріжджів роду *C. famata*.

Штами надсинтетики РФ - AF-4 та BRP, одержали шляхом поєднання класичного мутагенезу із методами генної інженерії (Сибірний, Федорович, Борецький та ін., 2006; Abbas and Sibirny, 2011; Dmytruk et al., 2011). За основу було взято дикий тип *C. famata* VKM Y-9. Мутагенез включав шість послідовних етапів. На першому етапі відбирали мутанти стійкі до структурного аналога РФ – 7-метил-8-трифторметил-10-(1'-d-рибітил) ізоалоксазину (200 мг/л) як селективного агента. Вихід РФ становив близько 35 мг/л РФ, при 2-3 мг/л РФ у дикого типу. Далі відбирали резистентні мутанти до 8-азагуаніну (200 мг/л). Найкращий штам синтезував 78 мг/л РФ та був використаний у наступному етапі селекції з 6-азаурацилом (200 мг/л) - інгібітором ІМН дегідрогенази. Одержані мутанти накопичували до 176 мг/л РФ. Далі проводили селекцію стійких штамів до інгібітора пуринового синтезу

6-діазо-5-оксо-L-норлейцину (5 мг/л), що продукували до 380 мг/л РФ. Неочікувано, було встановлено, що ріст *C. famata* пригнічується природним нуклеозидом - гуанозином (100 мг/л). Дане інгібування не відновлювалось шляхом додавання гуаніну. Мутанти, стійкі до гуанозину (300 мг/л) синтезували близько 450 мг/л РФ. Останнім кроком відбору, була селекція колоній здатних до надсинтезу РФ на твердому агаризованому середовищі із використанням 0,1 М фосфатного буферу, рН 6,8. За таких умов, флавіногенез значно пригнічувався, проте швидкість росту біомаси зберігалась. Серед вибраних яскраво-жовтих колоній, були знайдені клони, що зберегли та навіть збільшили активність флавіногенезу до 680 мг/л РФ. Важливо, що цей штам (отримав назву AF-4) володіє високою стабільністю та не ревертує за умов тривалого зберігання та вирощування. Хоча вихід РФ у штаму AF-4, нижчий в порівнянні із *der8*, його висока стабільність є хорошою передумовою для продовження удосконалення цього над синтетика з застосуванням методів генної інженерії. Одним із суміжних напрямків цієї роботи, було введення генів РФ-кінази (ген *FMN1*) та ФАД-ситази (ген *FAD1*), що дозволило створити на основі штаму AF-4 надпродуценти ФМН та ФАД *C. famata*, відповідно (Yatsyshyn et al., 2009; Yatsyshyn et al., 2014).

Для подальшого підвищення продукції РФ, у створений штам AF-4 було введено додаткові копії структурних (*RIB1* і *RIB7*, що кодують ферменти першої та кінцевої реакцій флавіногенезу), регуляторних та інших генів (ген транскрипційного фактору *SEF1* та ген *IMH3*, що кодує IMP-дегідрогеназу) (Dmytruk et al., 2011). Введення гена *SEF1* генетично близького до *C. famata* виду дріжджів *D. hansenii* у геном AF-4 привело до 1,9- кратного посилення синтезу РФ. У цих трансформантів було виявлено підвищену питому активність ГТФ- циклогідролази II та РФ- синтази, хоча механізми регуляції флавіногенезу цим транскрипційним фактором досі невідомі (Dmytruk et al., 2011). Інтеграція додаткової копії гена *SEF1* забезпечила 1,7-кратне підвищення виходу РФ у трансформантів (AF-4/2x*SEF1*) у порівнянні з AF-4/1x*SEF1*.

Створений рекомбінантний штам AF-4, що несе домінуючий селективний маркер *IMH3 D. hansenii* (кодує фермент задіяний у синтезі *de novo* ГТФ), здатний до 1,6- кратного підвищення рівня біосинтезу РФ. Введення структурних генів першого та останнього етапів синтезу РФ привело до 1,4- та 1,3- кратного збільшення для AF-4/*RIB1/RIB7* та AF-4/*2xSEF1/IMH3/RIB1/RIB7* трансформантів, порівняно з відповідними батьківськими штамми AF-4 і AF-4/*2xSEF1/IMH3*, відповідно. Вирощування сконструйованого штаму AF-4/*2xSEF1/IMH3/RIB1/RIB7* дозволило одержати максимальний вихід РФ на рівні близько 1 г/л (Dmytruk et al., 2011).

Наступним етапом, був підбір оптимальних умов вирощування та складу середовища для вирощування у біореакторі. Склад середовища моделювали використовуючи аналіз Плакета Берман та центральний композиційний аналіз. Оптимізований склад середовища був наступним (на 1 літр): 70 г глюкози; 4 г дріжджового екстракту; 1 г. сечовини; 1 г. аспарагіну; 2 г. гліцину; 0,2 г. KH_2PO_4 ; 1,2 г. K_2HPO_4 ; 0,6 г. MgSO_4 ; 0,1 г. CaCl_2 ; 50 мг. H_3BO_3 ; 5 мг. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 0,4 мг. тіаміну; біотину і мікроелементи у кінцевій концентрації: 0,2 мМ CuSO_4 ; 1,25 мМ KI ; 4,5 мМ MnSO_4 ; 2,0 мМ NaMoO_4 ; 17,5 мМ ZnSO_4 (Dmytruk et al., 2011, Dmytruk et al., 2014).

Експериментальним шляхом підтверджено значне підвищення виходу РФ штамом AF-4/*2xSEF1/IMH3/RIB1/RIB7* (2 і 4 рази) та приросту біомаси (4 і 11 разів) у використаному оптимізованому середовищі в порівнянні з класичними культуральними середовищами YPD і Беркгольдера, відповідно. З метою вивчення ролі активності перемішування та аерації на ріст і продукцію РФ, одержані надсинтетики *C. famata* вирощували в ферментерах об'ємом 1,3 і 7 л, встановлюючи аерацію на 0,6–1,2 vvm (об'єм повітря/об'єм рідини за хвилину) при перемішуванні 900–1200 об/хв. У ферментері 1,3 л. біомаса становила 43 г/л, а концентрація РФ досягла 7 г/л (максимальний ріст і продуктивність синтезу РФ) при перемішуванні 1100 об/хв та аерації 1,0 vvm. У ферментері 7 л біомаса становила 87 г/л і концентрація РФ 12-16 г/л при 1200 об/хв. і 1,2 vvm.

Максимальні значення одержані на 115 год. ферментації для ферментера об'ємом 1,3 л і 126 год. ферментації для 7 л ферментера, відповідно (Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2014).

Особливо важливим, була оптимізація вирощування *A. gossypii*, оскільки основним субстратом для синтезу РФ цими грибами є не прості вуглеводи, як у випадку бактерій чи дріжджів, а жири. Було показано, що додавання пуринів і поверхнево активної речовини Tween 80 (олеат натрію) активує синтез РФ, крім цього, він захищає міцелій від лізису (Goodsman and Ferrera, 1954; Smith et al., 1961, Szczesniak et al., 1971a, Hanson et al., 1967). Використання як джерела Карбону та Нітрогену олій (в основному – соєвої і рапсової) та відходів тваринництва - колагенових білків, шкіри, кісткового жиру - забезпечує високий рівень продукції цього вітаміну грибами *A. gossypii* (Szczesniak et al., 1971ab; Demain et al., 1972, Meating et al., 1999).

Використання дешевих субстратів має важливе прикладне значення для зниження вартості мікробного виробництва РФ. Слід звернути увагу на використання молочної сироватки (МС) як основного дешевого побічного продукту молочної промисловості (Prazeres et al., 2012; Pescuma et al., 2015; Pires et al., 2021). Одержання солодкої сироватки проводять шляхом додавання ферментів (схожих до сичужних) які забезпечують коагуляцію білків молока, тоді як кислу сироватку отримують шляхом закислення мінеральними кислотами або природним молочнокислим бродінням. Щорічний обсяг виробництва МС у світі становить близько 145 млн. тонн. Завдяки наявності широкого спектру мінеральних солей, білків (1-5 %), лактози (3-5 %), харчова цінність молочної сироватки досить висока.

Незважаючи на це, лише 60 % сироватки переробляється та використовується в основному в кондитерській промисловості та виробництві хлібобулочної продукції. З сироватки отримують сироваточний протеїн та інші цінні продукти. Також її застосовують як кормову добавку в тваринництві (Чернюшок та ін., 2011). Беручи до уваги обсяги щорічного виробництва МС, її

використання як культурального середовища для мікробного синтезу РФ може слугувати вагомим чинником зниження собівартості цього виробництва. Цікаво, що серед досліджених дріжджових штамів, саме найбільш флавіногенний штам *C. famata* виявив найактивніший ріст та продукцію РФ на МС.

Подальше удосконалення вже створених надпродуцентів РФ *C. famata*, шляхом генетичної модифікації структурних і регуляторних генів, генів транспортної системи у поєднанні із використанням дешевої МС значно збільшує потенціал *C. famata* як нового перспективного промислового продуцента РФ.

1.6. Біосинтез розеофлавіну та амінорибофлавіну бактеріями *Streptomyces davaonensis* і механізми їх антибіотичної дії

До групи флавінів, крім РФ та його коферментних форм ФМН та ФАД відносяться також дві антибіотичні флавінові сполуки - розеофлавін (РоФ) та його метаболічний попередник амінорибофлавін (АФ). Ці сполуки синтезуються ґрунтовими бактеріями роду *Streptomyces davaonensis* і *Streptomyces cinnabarinus* (Otani et al., 1974; Matsui et al., 1979; Otani et al., 1980; Schwarz et al., 2016).

Важливим напрямком сучасної медицини, є пошук та впровадження нових антибіотичних сполук для лікування складних інфекційних захворювань. В першу чергу, це стосується інфекцій викликаних бактеріями, здатних швидко набувати резистентності до вже існуючих антибіотиків і таким чином призводити до важких ускладнень із високою ймовірністю летальних випадків. Одним із найбільш поширених та небезпечних патогенних збудників, вважається вже згаданий раніше - золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) та його метицилін- резистентні штами (MRSA). Зазвичай, інфікування відбувається при проведенні хірургічних втручань та інших відкритих

пошкодженнях шкіри і слизової оболонки, одержаних в т.ч. при проведенні бойових дій. Захворювання, як правило, проходить у важкій формі із характерними для бактерійних інфекцій симптомами.

РоФ та АФ проявляють високу антибіотичну активність проти ряду патогенних мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Plasmodium falciparum* та ін. Детальну інформацію можна почерпнути у працях: Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017; Jankowitsch et al., 2011 Hemasa et al., 2022. Потрапляючи у клітину - мішень через транспортні системи РФ, ці сполуки формують функціонально - неактивні структурні аналоги флавінових коферментів РоФМН/РоФАД та АФМН/АФАД, замість оригінальних ФМН та ФАД, відповідно (Pedrolli et al., 2011; Pedrolli et al., 2013). Взаємодіючи із флавін - залежними білками, вони, інактивують їх каталітичні активності, що призводить до мультифункціональних порушень флавін-залежних метаболічних шляхів і, як наслідок, загибелі бактерійних клітин. Також встановлено, що РоФМН/РоФАД та АФМН/АФАД зв'язуються із регуляторними ділянками ФМН - рибо свіч, приводячи до репресії РФ-оперона та дефіциту РФ у клітині (Serganov et al., 2009; Lee et al., 2009; Pedrolli et al., 2014). Варто зауважити, що РоФ проявляє також цитотоксичну дію на клітини людини, тому широке використання його в якості протиінфекційного агенту без відповідних модифікацій малоперспективне. Основним чином, він може бути використаний як ефективна модель для досліджень і розробки нових протипухлинних препаратів. Висока метаболічна активність флавін-залежних білків у ракових клітинах є хорошою мішенню для терапевтичного використання РоФ.

На відміну від РоФ, його попередник АФ, проявляє цитотоксичну дію головню на бактерійні клітини, не викликаючи значних порушень у функціонуванні клітин людини, що дозволяє використати цю сполуку для створення нових лікарських засобів для боротьби саме із інфекційними

захворюваннями. Вибірковість дії АФ пояснюється здатністю людської РФ-кінази каталізувати перетворення АФ у АФМН, проте неспроможністю людської ФАД-синтази забезпечити подальше перетворення АФМН в АФАД. У випадку із РоФ, обидва ферменти РФ-кіназа та ФАД-синтаза людини перетворюють РоФ у РоФМН та РоФАД, відповідно (Pedrolli et al., 2011; Pedrolli et al., 2013).

Проведені дослідження показали, що РоФ і АФ синтезуються з РФ. Використання РФ, міченого радіоактивною міткою [U-15N], як субстрату, та подальший аналіз культурального середовища методом рідинної хроматографії та мас-спектрометрії (PX/MC) дозволили встановити, що всі чотири атоми азоту [U-15N] РФ включені в склад РоФ. Таким чином, РФ використовується безпосередньо як вихідний субстрат для синтезу АФ та РоФ (Matsui et al., 1979; Otani et al. 1980). Синтез РоФ і АФ *S. davaonensis* відбувається на низькому рівні, тому використання цих бактерій для промислового мікробного синтезу нерентабельне. На даний час РоФ та АФ одержують високовартісним методом хімічного синтезу.

Зовсім недавно було виявлено, що у *S. davaonensis* АФ утворюється шляхом 4 послідовних реакцій. Перші 3 реакції каталізуються N,N-8-деметил-8-амінорибофлавін-5'-фосфатсинтазою (RosB), а остання – фосфатазою. Структура ферменту RosB характеризується чотирма флаводоксиноподібними субодинамиціями зі специфічними розширеннями та унікальним С-кінцевим плечем (Konjik et al., 2017). Наступні реакції синтезу РоФ із утвореного АФ каталізуються ферментами N,N-8-деметил-8-амінорибофлавіндиметилтрансферазою (RosA) та фосфатазою RosC (Рис. 1.4; Schwarz et al., 2016; Schneider et al., 2020). Фермент RosA складається з двох доменів: α -спірального «ортогонального пучка» та домену Россмана (α/β скручений відкритий лист) (Jankowitsch et al., 2011; Tongsook et al., 2016).

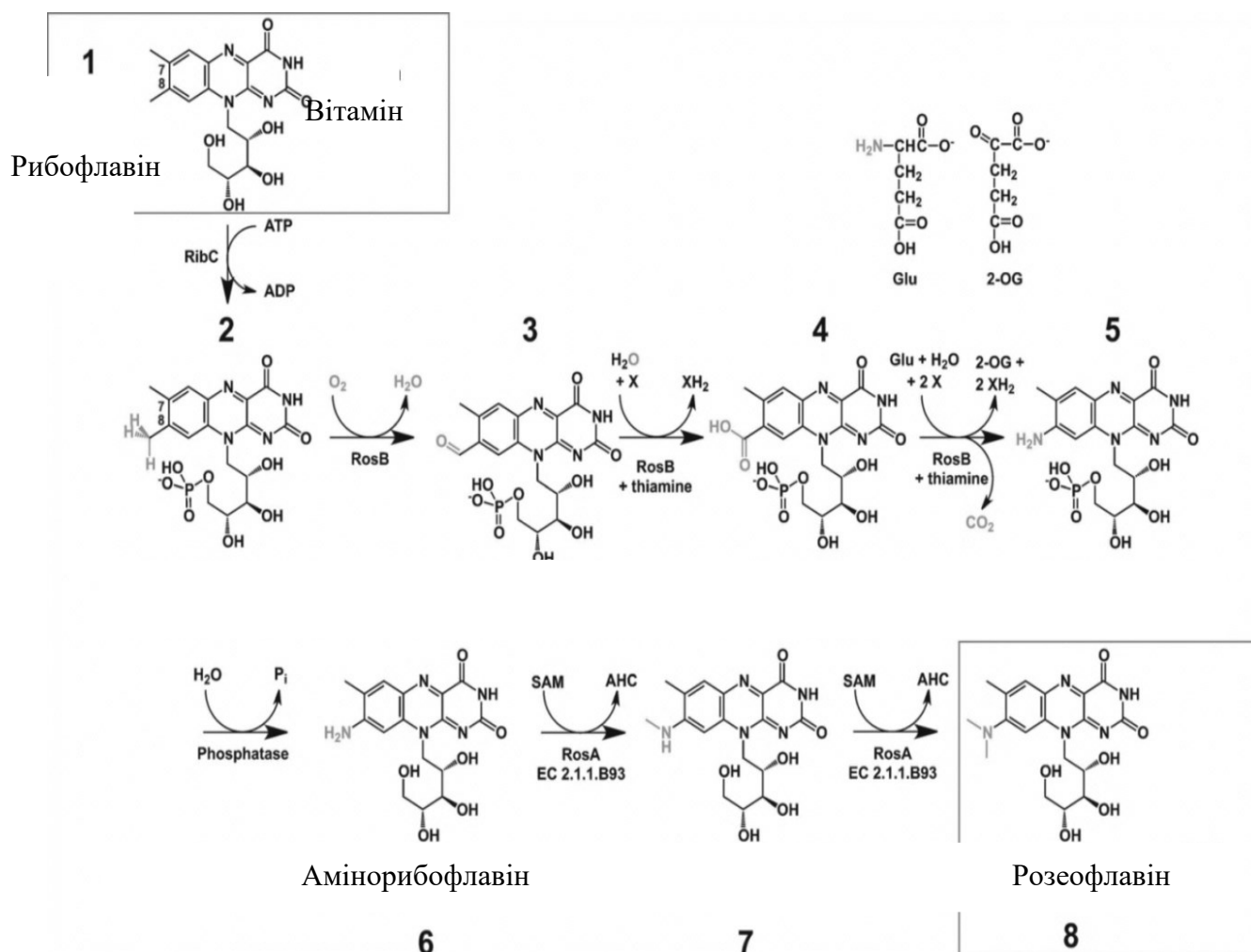


Рис. 1.4. Біосинтез антибіотика розеофлавіну та його метаболічного попередника амінорибофлавіну у бактерій *Streptomyces davaonensis* (Schwarz et al., 2016).

Оскільки синтез цих антибіотичних сполук починається із РФ, через формування, як проміжної метаболічної сполуки ФМН, перенесення структурних генів біосинтезу РоФ і АФ в геном флавіногенних мікроорганізмів є перспективним напрямком конструювання надсинтетиків РоФ і АФ. Використання вже створених у нашому відділі (Інститут біології клітини НАН України, Львів) дріжджових штамів надсинтетиків РФ і ФМН як платформи для конструювання дріжджових надсинтетиків РоФ та АФ є надзвичайно перспективним напрямком медичної біотехнології та мікробіології.

Оскільки процес ендogenous біосинтезу РФ характерний для мікроорганізмів, в т.ч. патогенних бактерій, та відсутній у людини, РоФ та АФ володіючи додатково РФ- рибосівч інгібіторною активністю (Serganov et al., 2009; Ott et al., 2009; Pedrolli et al., 2014), набувають ще більш вибіркової специфічної протиінфекційної активності, як потенційні лікарські засоби.

1.7. Підсумок

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

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

Експериментальні дослідження проводили із використанням реактивів, ензимів та аналітичних наборів ряду фірм: «Sigma», «NEB», «Promega», «Difco» США; «Fermentas» Литва; «Roth» Німеччина та ін. Також, використовували вітчизняні реактиви ступеня чистоти: «ХЧ» та «ОСЧ».

2.2. Штами мікроорганізмів

У роботі використали різні штами мікроорганізмів як дикого типу так і генетично модифіковані: дріжджі *Candida famata*, *Debaryomyces hansenii* та бактерії *Streptomyces davaonensis*, *Escherichia coli*. Детальний опис генотипів використаних мікроорганізмів наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Штами мікроорганізмів, використані у роботі

Штами	Генотип/Примітки	Посилання
<i>D. hansenii</i> CBS767	Штам дикого типу	CBS (The <u>C</u> entraal <u>b</u> ureau voor <u>S</u> chimmelcultures)
<i>C. famata</i> VKM-Y9	Штам дикого типу	ВКМ (Всероссийская <u>к</u> оллекция <u>м</u> икроорганизмов)
<i>C. famata</i> AF-4	Отриманий методом класичного мутагенезу	Dmytruk et al., 2011

<i>C. famata</i> BRP	AF-4/2xSEF1/IMH3/RIB1/RIB7	Dmytruk et al., 2014
<i>C. famata</i> BRPI	BRP/PRS3m/ADE4m	Dmytruk et al., 2020
<i>C. famata</i> FP	AF-4//IMH3/FMN1	Yatsyshyn et al., 2009
<i>Streptomyces davaonensis</i>	Штам дикого типу	ВКМ (Всероссийская коллекция микроорганизмов)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	(Φ 80dlacZ Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169)	Ausubel et al., 1990

2.3. Плазміди

Плазміди pUC57 (Thermo Fisher Scientific, США), pTb (Dmytruk et al., 2006; Dmytruk et al., 2011), pNTC/ pLAC4_{ca} - SEF1_{cf} (Andreieva et al., 2020) були використані для конструювання та введення у геном реципієнтних штамів дріжджів експресійних касет із цільовими генами та генами стійкості до антибіотика. Обрані плазміди носії забезпечували реплікацію у бактеріях для одержання препаративних кількостей плазмідної ДНК та подальше інтегрування їх лінеаризованих форм у дріжджовий геном.

2.4. Праймери

У роботі використовували праймери для ампліфікації генів та промоторів із геномів дріжджів *C. famata*, *D. hansenii*. Праймери містили сайти ендонуклеазної рестрикції для подальшого клонування ампліфікованих ДНК-

фрагментів у плазміді носії. Також праймери застосовували для ПЛР-скринінгу та перевірки одержаних колоній трансформованих дріжджів. Перелік праймерів наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

ПЛР-праймери, використані у роботі

Праймери (ампліфіковані гени, промтори)	Нуклеотидна послідовність праймера 5' → 3'
Ко817 (ген <i>RFE1</i> <i>D. hansenii</i>):	CGCGGATCCATGATATCTATAAGTAACCCAATG
Ко818 (ген <i>RFE1</i> <i>D. hansenii</i>):	AAACTGCAGTCACTTTCTCAACTTTAAACCAAC
Ко1068 (промотор гена <i>SEF1</i> <i>C. famata</i>):	TTTGGGCCCTATATAGAGACAATAAGACCAG
Ко1069 (промотор гена <i>SEF1</i> <i>C. famata</i>):	CGCGGATCCGTTGAGTATATATCTATTACTTC
OL23 (разом із Ко1068 короткий фрагмент гена <i>SEF1</i>)	AGGTTGAAGTGGGAATTGCATC
RBFa (фрагмент гена <i>rosB</i>)	TATTGAACACAACCTTGCGTCG
RBRa (фрагмент гена <i>rosB</i>)	ATCCTAACTGAGATTCCTCAACC

2.5. Культуральні середовища

Штами дріжджів *C. famata* та *D. hansenii* вирощували у різних поживних середовищ за температури 28 С із постійним перемішуванням на шейкерах. Тривалість культивування залежала від мети експериментів і була від 24 до 120 год. Культивування проводили у скляних пробірках та колбах (кінцеві об'єми 2 та 10 мл середовища, відповідно). Перелік використаних середовищ та їх склад представлено у таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Середовища для вирощування дріжджів

Назва середовища	Склад середовища, г/л
YPD	Пептон – 20; дріжджовий екстракт – 10; глюкоза – 20; агар-агар – 20 (для щільних агаризованих середовищ).
YNB / YNB+YE	Глюкоза – 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaCl – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; інозитол – 0,002; борна кислота – 0,0005; ніацин – 0,0004; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0004; піридоксину гідрохлорид – 0,0004; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0004; тіаміну гідрохлорид – 0,0004; кальцію пантотенат – 0,0004; FeCl_2 – 0,0002; Na_2MoO_4 – 0,0002; рибофлавін – 0,0002; п-амінобензойна кислота – 0,0002; KI – 0,0001; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,00004; фолієва кислота – 0,000002; біотин – 0,000002; лейцин – 0,4; урацил – 0,4 З додаванням або без дріжджового екстракту (YE) (0,2 %)
YPL	Пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5; лактоза – 20

СБ	Сахароза – 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; Біотин – 0,0001; мікроелементи – 0,5 мл; залізо (у вигляді солі Мора) – 0,4
Опт1	глюкоза – 20; сечовина – 1; YE – 5; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; H_3BO_4 – $0,076 \times 10^{-3}$; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – $0,059 \times 10^{-3}$; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,070 \times 10^{-3}$; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ – $0,260 \times 10^{-3}$; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – $17,308 \times 10^{-3}$; біотин – 1×10^{-6}
Опт2	глюкоза – 70; YE – 4; сечовина – 1; аспарагін – 1; гліцин – 2; KH_2PO_4 – 0,2; K_2HPO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,6; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; H_3BO_4 – 50×10^{-3} ; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – 5×10^{-3} ; тіамін – $0,4 \times 10^{-3}$; біотин – 1×10^{-6} ; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 50×10^{-3} ; KI – $207,5 \times 10^{-3}$; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,25; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ – $353,14 \times 10^{-3}$; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,023
YNB гліцеролом	із 1) YNB + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 г/л) + гліцерол (0,5-2 %); 2) YNB + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 г/л) + неочищений технічний гліцерол (0,5-2 %)

Бактерії *S. davaonensis*, які є природними продуцентами розеофлавіну та амінорибофлавіну вирощували у різних поживних середовищах (Табл. 2.4).

Середовища для вирощування бактерій *Streptomyces davaonensis*

Назва середовища	Склад г/л
Крохмально казеїнове	крохмаль - 10,0; казеїн - 0,3; KNO ₃ - 2,0; NaCl - 2,0; K ₂ HPO ₄ - 2,0; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,05; CaCO ₃ - 0,02; FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,01
Крохмально дріжджове (YE)	крохмаль* - 10,0; YE - 2,0; KNO ₃ - 2,0; NaCl - 2,0; K ₂ HPO ₄ - 2,0; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,05; CaCO ₃ - 0,02; FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,01
Matsui	Манноза -10,0; NaCl – 1,0; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 1,0; K ₂ HPO ₄ – 1,0; CaCO ₃ – 2,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 2,0; FeSO ₄ ·7H ₂ O - 1,0; MnCl ₂ ·4H ₂ O - 1,0; ZnSO ₄ ·7H ₂ O - 1,0
YMG	мальт екстракт - 10,0; глюкоза - 4,0; YE - 4,0
TSB	глюкоза - 2,5; соєвий екстракт - 3,0; казеїн - 17,0; NaCl - 5,0; K ₂ HPO ₄ - 2,5

* Середовище «крохмально - дріжджове», також було використано із заміною крохмалю на екстракт мальтози, маннозу, манніт, сахарозу та глюкозу в концентраціях 1% і 2%, відповідно.

Середовища стерилізували автоклавуванням. Розчини температурочутливих сполук фільтрували із використанням нітроцелюлозних фільтрів (діаметр пор 0,2 мкм). Для приготування щільних середовищ вносили агар у кінцевій концентрації 2%.

Для селекції трансформантів використовували антибіотики відповідно до селекційних генів використаних плазмід: флеоміцин (20 - 30 мг/л), норзеотрицин (5 - 10 мг/л) та мікофенольну кислоту (20 - 25 мг/л).

Дослідження росту і флавіногенезу дріжджів проводились у молочній сироватці (Польща): не концентрованої із 2,5- 5% вмістом лактози та у концентрованої 7,5- 15 %, з або без додавання $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 г/л).

Хімічний склад молочної сироватки, %: білки - 0,8; жири - 0,26; лактоза - 4,96; суха маса - 7,08 (дані від Biologiczno-Rolniczy Uniwersytet Rzeszowski). Вміст Нітрогену в молочній сироватці (дані від Centralne Laboratorium Badawcze Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublin) (мг/г): нітроген- 1,2; амінокислоти: Asp - 0,708; Thr - 0,313; Ser- 0,312; Glu - 1,32; Pro - 0,434; Gly - 0,122; Ala - 0,298; Cys - 0,183; Val - 0,305; Met - 0,161; Ile - 0,301; Leu - 0,708; Tyr - 0,251; Phe - 0,245; His - 0,135; Lys - 0,666; Arg - 0,119; Trp - 0,212.

Бактерії *E. coli* DHα вирощували за температури 37 С у багатому середовищі LB (г/л: пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5; NaCl – 5; 2 н NaOH – 1 мл/л) на шейкері. Відбір трансформованих колоній бактерій проводили на щільному агаризованому середовищі LB із використанням антибіотика ампіциліну в концентрації 100 мг/л.

2.6. Програмне забезпечення для аналізу нуклетотидних послідовностей

Для пошуку та аналізу нуклеотидних послідовностей генів та промоторів дріжджів *C. famata* та *D. hansenii* а також розробки ПЛР-праймерів використовували електронні бази даних: <http://genome.jgi-psf.org>, <http://yeastgenome.org>, <http://ncbi.nlm.gov/BLAST>, <http://tools.neb.com/NEBcutter2> і <https://www.thermofisher.com>. Оптимальні температури посадки праймерів на ДНК матрицю визначали із застосуванням програм <http://basic.northwest.edu/biotools/oligocalc.html> та <http://bioinformatics.org>. Одержані дані дозволили підібрати оптимальні умови та провести успішні ПЛР ампліфікації необхідних ДНК фрагментів із подальшим конструюванням на їхній основі експресійних касет.

2.7. Базові молекулярно генетичні методи

Конструювання рекомбінантних штамів проводили шляхом послідовних етапів ряду молекулярно-генетичних підходів із необхідними модифікаціями (Sambrook, 1989).

2.7.1. Виділення плазмідної ДНК з бактерійних клітин

Для одержання препаративних кількостей плазмідної ДНК, клітини бактерій *E. coli* ДН_a культивували упродовж 14-18 год у багатому поживному середовищі із антибіотиком апіциліном (100 мг/мл) в колбах на шейкері. Одержану суспензію клітин центрифугували за 4 тис. об./хв, 5 хв. Супернатант видаляли. Осад клітин ресуспендували у 1 мл ТЕ-буферу (pH 7,5) і додавали 2 мл 0,2 М розчину NaOH та 1% SDS. Клітини лізували упродовж 15 хв за кімнатної температури. Білки осаджували додаючи 1,5 мл 2 М розчину ацетату калію, плавно перемішуючи, та витримували на льоді упродовж 15 хв. Осад білків видаляли центрифугуванням (10 тис. об./хв, упродовж 15 хв). Для виділення ДНК та РНК, в отриманий розчин додавали 0,7 об'єму ізопропанолу, перемішували та центрифугували 10 тис. об./хв, упродовж 15 хв. Осад промивали із 70% етанолом та розчиняли у ТЕ-буфері. Видаляли РНК, використовуючи літіказу або преципітацію із 7 М амонієм ацетатом із повторним осадженням. Очищену плазмідну ДНК осаджували центрифугуванням та промивали 70% етанолом. Розчиняли ДНК у ТЕ-буфері для тривалого замороження (-20 C) та використання.

За необхідності, плазмідну ДНК високого ступеня чистоти, отримували використовуючи Wizards Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) відповідно до протоколу від виробника.

2.7.2. Виділення сумарної ДНК з дріжджових клітин

Сумарну ДНК дріжджів *C. famata* та *D. hansenii* виділяли, використовуючи адаптовану методику для *S. cerevisiae* (Johnston, 1994).

Дріжджові клітини вирощували в 3 мл рідкого поживного середовища до завершення логарифмічної фази росту (значення оптичної густини OD₆₀₀ становило 4-5, кювета 1 см). Клітини осаджували центрифугуванням (3 тис. об./хв, 10 хв) та ресуспендували у 0,3 мл 50 мМ розчині етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) (рН 8,0). До суспензії клітин додавали літиказу та інкубували 1 год за температури 37 С. Клітини осаджували центрифугуванням, надосадову рідину зливали, а осад ресуспендували у 0,3 мл лізуючого розчину (0,2 % додецилсульфат натрію (SDS), 50 мМ ЕДТА). Суспензію клітин інкубували за температури 65 С упродовж 30 хв, після чого охолоджували та додавали 0,1 мл 3 М ацетату калію (рН 5,2). Суспензію перемішували, охолоджували на льоді та центрифугували 10 тис. об./хв, упродовж 5 хв. Одержаний супернатант переносили у пробірки, вносили 0,3 мл ізопропанолу, перемішували та витримували 10 хв. ДНК осаджували шляхом центрифугування 10 тис. об./хв, 5 хв та промивали 70% етанолом. Одержаний осад підсушували та розчиняли у ТЕ-буфері (10 мМ тріс-НCl, рН 8,0; 1 мМ ЕДТА, рН 8,0). Далі, руйнували РНК внесенням РНКазі А (10 мг/мл) інкубуючи за температури 37 С упродовж 20 хв. До проб додавали фенол (100 мкл), перемішували та центрифугували (10 тис. об./хв, 15 хв). Водну фазу переносили у нові пробірки із 2-ма об'ємами 96% етанолу та 0,1 об'ємом 3 М ацетату калію (рН 5,2), перемішували та витримували за температури -20 С, упродовж 15 хв. Суспензію центрифугували 10 тис об./хв упродовж 15 хв. Осад промивали 70% етанолом, підсушували та розчиняли у ТЕ буфері. Одержану сумарну ДНК дріжджів зберігали за температури -20 С для подальшого використання.

2.7.3. Полімеразноланцюгова реакція

Плазмідну ДНК бактерій та сумарну ДНК дріжджів виділяли за методами описаними (Sambrook, 1989; Johnston, 1994) із необхідними модифікаціями (див. розділи вище). Ампліфікацію ДНК фрагментів проводили як описано (Sambrook, 1989) із специфічними парами праймерів синтезованим фірмами «IDT Technologies», «Sigma» (США) та ДНК полімеразою «Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity» (Invitrogen, США). Для проведення ПЛР реакції використовували GeneAmps PCR System 9700 (Applied Biosystems, США). ДНК аналізували методом електрофоретичного розділення у гелі агарози із подальшим очищенням на колонках «Quiagen» (Quiagen PCR purification kit, США).

2.7.4. Полімеразноланцюгова реакція у реальному часі

РНК із клітин дріжджів виділяли використовуючи набір реагентів «GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit with DNase I» (EURx Ltd, Польща). Клітини осаджували центрифугуванням 3000 об./хв, 10 хв та ресуспендували в 1 мл Трізолу. Руйнування клітин проводили перемішуванням (6 тис. об./сек, упродовж 20 сек) із скляними кульками «балотіні» (діаметр 0,45 мм). Супернатант відділяли центрифугуванням (14 тис. об./хв, 15 хв), переносили у чисті пробірки та додавали 0,2 мл хлороформу. Інкубували упродовж 5 хв та центрифугували 14 тис. об./хв, упродовж 15 хв. Із одержаної водної фракції РНК осаджували методом преципітації із 0,5 мл ізопропанолу та наступним центрифугуванням (14 тис. об./хв, 15 хв). Осаджену РНК промивали 70% етанолом, підсушували і розчиняли у воді (воду обробляли діетилпірокарбонатом (DEPC). Концентрацію РНК вимірювали з використанням приладу Picodrop Microlitr UV/Vis Spectrophotometer (LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Німеччина) та розчиняли у воді. ПЛР-реакцію проводили, використовуючи прилад Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR

System (США) та набір реактивів «SG OneStep qRT-PCR kit» (EURx Ltd., Польща). Як матрицю для ПЛР використовували виділену РНК клітин та барвник ROX для нормалізації свічення інтеркалюючих барвників «Syber Green» відповідно до протоколу від виробника. ПЛР ампліфікацію проводили за наступних параметрів: синтез кДНК - 30 хв/50 С; первинна підготовка «плавлення ДНК» – 3 хв/95 С; 40 циклів 15 сек/94 С; 30 сек/60 С. Результати одержані із трьох повторів представляли як відносну кількісну оцінку RQ (Relative quantification).

2.7.5. Конструювання плазмід із експресійними касетами

Конструювання плазмід із запланованими експресійними касетами проводили згідно методики (Sambrook, 1989). Необхідні гени та промоторні ділянки ДНК ампліфікували, використовуючи як матрицю, виділену заздалегідь (див. вище) геномну ДНК дріжджів методом ПЛР. Фрагменти ДНК аналізували та очищали. Для проведення конструювання, ДНК фрагменти та плазміди – носії обробляли ендонуклеазами для одержання «липких» кінців згідно протоколів від фірм виробників: Fermentas (Литва), NEB і Promega (США). Лігування забезпечували інкубацією із Т4-лігазою через ніч в умовах плавно спадаючої температури (від кімнатної до 4 С.) Для цього епендорфи із лігаційними взірцями ДНК поміщали у пластикові фалкони, заповнені клаптиками фільтрувального паперу для термоізоляції, та залишали в холодильнику упродовж ночі.

Для одержання сконструйованих плазмід лігаційні суміші вводили у бактерії методом електропорації (Sambrook, 1989). Селекцію трансформованих колоній проводили посівом бактерій на щільне агаризоване середовище з антибіотиком ампіциліном.

2.7.6. Трансформація дріжджів *Candida famata*

Одержані препаративні кількості плазмідної ДНК лінеаризували та вводили у реципієнтні штами дріжджів *C. famata* за методикою описаною (Voronovsky et al., 2002) із певними модифікаціями. Для цього клітини *C. famata* вирощували у пробірці із 2 мл YPD упродовж 2 діб. Далі клітини переносили у 100 мл колби із 10 мл середовища YPD та вирощували упродовж ночі до OD 600 нм = 1,8-2,0. Клітини осаджували центрифугуванням (3 тис. об./хв., 10 хв). Далі клітини ресуспендували в залишку середовища, додавали 40 мл 50 мМ калій-фосфатного буферу із 25 мМ ДТТ та інкубували за 30 С 15 хв. Клітини тричі промивали холодною водою та осаджували центрифугуванням (3 тис. об./хв, 10 хв, 4 С). На завершальному етапі, клітини промивали 1М сахарозою, та ресуспендували у залишку сахарози до OD близько 300. Компетентні клітини переносили по 200 мкл у пробірки типу «епендорф» та зберігали на льоді. У суспензію клітин вносили лінеаризовану плазмідну ДНК (5-10 мкг), плавно перемішували, переносили в охолоджені кювети на льоді з наступним проведенням електропорації. Клітини вимивали із кювет 1 мл 1 М сахарози та переносили у скляні пробірки із 1 мл 2-х кратного YP середовища. Клітини інкубували 2-3 год на шейкері (200 rpm, 28 С). Після цього, клітини висівали на селективне агаризоване середовище з антибіотиком. Появу поодиноких колоній дріжджових трансформантів спостерігали на 5-7 добу.

2.8. Біохімічні методи

Аналіз флавіногенної активності та росту одержаних рекомбінантних штамів проводили спектрофотометрично та із використанням хроматографічного аналізу.

2.8.1. Аналіз продукції флавінів та визначення біомаси

Дріжджові клітини вирощували у поживних середовищах відповідно до поставленої мети експерименту. Біомасу дріжджових клітин визначали методом спектрофотометричного аналізу (OD – 600 нм, кювета 1 см) із використанням приладу Thermo Scientific Spectrometer Helios Epsilon (Fisher Scientific UK Ltd., Англія).

Для аналізу продукції флавінів, біомасу осаджували шляхом центрифугуванням (3 тис. об./хв, 10 хв) та видаляли. Вміст флавінів визначали у культуральному середовищі з використанням флуорометра Turner Quantech Digital Filter Fluorometr FM109510-23 (США) із фільтром збудження NB440 та емісії SC535 відповідно до протоколу від виробника. Попередній аналіз продукції амінорибофлавіну (АФ) проводили методами хроматографії на папері у 5% Na_2HPO_4 та спектрофотометрії (за піком поглинання для АФ – 478 нм). Більш ґрунтовний мас-спектрометричний аналіз одержаного АФ проведений в Жешувському університеті (Польща) в межах договору про співпрацю.

2.8.2. Визначення вмісту флавінів у клітинах дріжджів

Осаджені центрифугуванням (3 тис. об./хв, 10 хв) клітини дріжджів (20-50 мг) відмивали та ресуспендували в 1 мл дистильованої води. До суспензії додавали 0,25 мл 5% трихлороцтової кислоти, перемішували та інкубували упродовж 30 хв за 4 С. Суспензію центрифугували (10 тис. об./хв, 1 хв). Надосадову рідину переносили у пробірки, осад повторно промивали 1 мл 5% трихлороцтової кислоти та центрифугували. Супернатанти зливали разом. Супернатант в об'ємі 1 мл інкубували упродовж доби за 37 С. Після цього, вносили 0,25 мл 2,4 М $\text{K}_2\text{H}_3\text{PO}_4$, 1 мл дистильованої води та проводили виміри вмісту флавінів.

2.8.3. Отримання без клітинних екстрактів

Одержання безклітинних екстрактів проводили шляхом руйнування клітин скляними кульками «Балотіні». Для цього, відмиті клітини ре суспендували у буфері із 1мМ фенілметансульфонілфторидом (PMSF, 50-100 мг/мл). Одержану суспензію із скляними кульками діаметром 0,45-0,5 мм в кількості 1/3 від об'єму суспензії заморожували. Після цього, проводили руйнування клітин вібрацією упродовж 12 хв за 4 С та охолодженням на льоді кожні 3 хв. До отриманого гомогенізату вносили ще одну порцію PMSF (в залежності від густини суспензії) та центрифугували 10 тис об./хв упродовж 30 хв за температури 0 С. Аліквоти безклітинного екстракту використовували для подальших аналітичних досліджень.

2.8.4. Визначення концентрації білка у безклітинному екстракті

Вміст білка визначали методом Лоурі (Lowry et al., 1951). Вимірювання проводили із використанням реакційної суміші: 1 мл 2% розчину Na_2CO_3 в 0,1н NaOH, 20 мкл 0,5% розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% цитраті, 100 мкл реактиву Фоліна та 200 мкл розведеного безклітинного екстракту. Вимірювання проводили спектрофотометрично за довжини хвилі 750 нм із використанням як стандарту калібрувальної кривої бичачого сироваточного альбуміну.

2.8.5. Визначення активності ГТФ-циклогідролази II

Активність ферменту ГТФ-циклогідролази II визначали після діалізу безклітинного екстракту проти 20 мМ тріс-HCl буферу (pH 8,0), із 2 мМ MgCl_2 та 2 мМ дитіотрейтолом (ДТТ) упродовж 12 год за температури 4 С. Як реакційну суміш використовували 20 мМ тріс-HCl буферу (pH 8,0) із 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ дитіотрейтолом (ДТТ), 0,5 мМ ГТФ та 0,5 мг безклітинного екстракту (30 хв, 37 С). Реакцію інгібували внесенням диацетилу (кінцева

концентрація 0,5 мг/мл) та подальшим кип'ятінням упродовж 30 хв. Це забезпечило перетворення нестабільного продукту (імовірно, 2,5 діаміно-6-рибозиламіно-4-(3Н)-піримідиндіонфосфату) через реакцію із діацетилом у стабільний флюорисціюючий 6,7-диметилптерин. Флюорисценцію вимірювали при довжині хвилі 360 нм (збудження) та 430 нм (емісії). Одиницею активності ферменту вважали його кількість, що забезпечує синтез 1 мкмоль 6,7 диметилптерину упродовж 1 хв.

2.9. Статистичний аналіз експериментальних даних

Статистичну обробку одержаних результатів проводили стандартними методами аналізу. Експерименти проводили у трьох повторах із трьома паралелями. Наведені графіки та діаграми представляють середнє значення «М», що отримали за результатами трьох вимірювань в одному із декількох однотипових дослідів. Середня похибка «m» визначалась із середньої квадратичної похибки «б». На графіках вона відображена у вигляді вертикальної лінії біля кожного значення та відповідає значенню «m». Різницю у величинах вважали достовірною на основі показника вірогідності різниці «t» (критерій Стюдента). Відмінність даних приймали за достовірну при значенні імовірності різниці «р» меншою 0,05. Результати дослідів представляли у вигляді графіків та таблиць із середніми значеннями $\pm$ стандартне відхилення.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Конструювання рекомбінантних штамів *Candida famata* із надекспресією гена РФ-екскретази дріжджів *Debaryomyces hansenii* - *RFE1_Dh*

Одним із способів підвищення продукції цільових метаболітів є посилення їх екскреції. Дослідження механізмів транспорту РФ у дріжджів активно проводили у лабораторії проф. Шавловського Г. М. починаючи із кінця 70-х років XX століття (Shavlovsky et al., 1977; Сибирный и др., 1981; Sibirny et al., 1984). Оскільки флавіногенні дріжджі за певних умов можуть нагромаджувати в культуральній рідині значні кількості РФ, висловлено припущення, що посилення екскреції РФ призведе до зростання продукції РФ не тільки штамом дикого типу, а й сконструйованими раніше у відділі молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України надсинтетиками РФ. Було заплановано провести клонування та введення в геном надсинтетика BRP (BRP, Best Riboflavin Producer) *C. famata* (Dmytruk et al., 2011) гена РФ-екскретази. Слід зазначити, що схоже до ситуації із дріжджами *P. guilliermondii*, система екскреції у *C. famata* виявлена, проте транспортні білки та відповідні гени все ще не ідентифіковані. Надекспресія гена РФ-екскретази у дріжджах відкриває нові можливості для підвищення мікробної продукції РФ за рахунок активації процесів транспортування цільового продукту із дріжджових клітин у культуральне середовище.

Геном дріжджів *C. famata* лише частково секвенований, тому для пошуку гомологічного гена РФ-екскретази та його подальшого клонування використали добре вивчений та повністю секвенований геном близького до дріжджів *C. famata* виду *D. hansenii* CBS767. Білок *bcrp1* ссавців (кодується геном *BCRP1*) забезпечує транспорт РФ із клітин молочної залози у молоко. Тому нами був проведений пошук гомологічності до ДНК послідовності гена *BCRP1 Homo sapiens* (NP_001335914.1) у електронній базі даних геному *D. hansenii*. Це

дозволило виявити 14 передбачуваних потенційних генів транспортерів родини ABC (англ. ATP-binding cassette transporters). Відповідно до розташування та кількості трансмембранних доменів, лише ген DEHA2C03784g (29 % ідентичності, 49 % подібності, 5 % пробілів) показав найбільшу схожість з геном *BCRP1 H. sapiens*. Ідентифікований ген *D. hansenii* одержав назву *RFE1_Dh* (**R**ibo**F**lavin **E**xcretase) та був ампліфікований з виділеної геномної ДНК *D. hansenii*. ПЛР- реакцію проводили із праймерами, що містили послідовності рестрикційних сайтів для ендонуклеаз *Bam*HI та *Pst*I (ExFw: cgcGGATCCatgatatactataagtaacccaatg, ExRev: aaaCTGCAGtcactttctcaactttaaccaas, розмір продукту ПЛР - 1857 п.н.). Введені сайти використали для подальшого клонування ампліфікованого фрагменту в плазмиду-носії. Як основу використали інтегративну дріжджову плазмиду pUC57 із попередньо введеними в її склад промотором гена *TEF1 C. famata* та геном резистентності до антибіотика флеоміцину *ble Staphylococcus aureus*. Плазміда одержала назву pTb/prTEF1-RFE1 (Рис. 3.1).

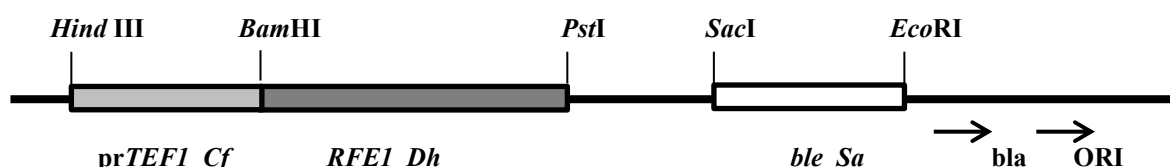


Рис. 3.1. Лінійна схема сконструйованої дріжджової інтегративної плазміди pTb/prTEF1-RFE1, що містить ген *RFE1 D. hansenii* РФ- екскретази (темно-сірий блок) під контролем конститутивного промотора гена *TEF1 C. famata* (світло-сірий блок). Як селективний маркер, використано ген резистентності до антибіотика флеоміцину *ble S. aureus* (білий блок) (розмір плазміди: 6743 п.н.).

Одержану плазмиду аналізували шляхом ендонуклеазної рестрикції. Щоб ідентифікувати наявність гена *RFE1_Dh* в плазміді, у всіх варіантах рестрикції

використали фермент *EcoRV*, сайт ендонуклеазної рестрикції якого міститься всередині гена *RFE1_Dh*.

Виявлення відповідних фрагментів після рестрикційного аналізу було здійснено за допомогою електрофоретичного розділення ДНК у 0,8 % агарозному гелі із додаванням EtBr (Рис. 3.2).

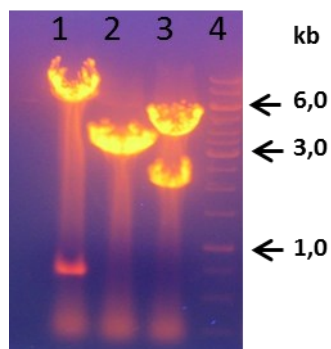


Рис. 3.2. Електрофореграма ендонуклеазної рестрикції сконструйованої плазмиди pTb/prTEF1-RFE1, що містить ген *RFE1_Dh* РФ-екскретази *Debaryomyces hansenii* під контролем конститутивно активного промотора *TEF1 Candida famata*. Для аналізу сконструйованої плазмиди проведено рестрикцію комбінацією із двох різних ендонуклеаз. Було отримано очікувані фрагменти ДНК (*EcoRV* / *HindIII* розмір фрагментів: 6078, 665 п.н; *EcoRV* / *NdeI*: 3658, 3085 п.н; *EcoRV* / *XhoI*: 4612, 2131 п.н; *Ikb DNA* маркер (Fermentas)).

Сайт ендонуклеазної рестрикції *EcoRV* міститься всередині гена *RFE1_Dh*, а отже використання даної ендонуклеази дозволяє чітко виявити присутність введеного у плазмиду гена.

Плазмиду pTb/prTEF1-RFE1, що містить модуль експресії prTEF1_Cf-*RFE1_Dh* лінеаризували ендонуклеазою *XhoI* і використали для трансформації штаму BRP *C. famata*. Метод трансформації дріжджів проводили згідно описаної методики (Voronovsky et al., 2002). Частота трансформації становила близько 50 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК. Відповідні колонії відбирали на агаризованому селективному середовищі з антибіотиком флеоміцином у концентрації 20 мг/л після п'яти днів вирощування.

Стабілізацію флеоміцин- резистентних трансформантів проводили шляхом вирощування на неселективному середовищі з наступним перенесенням на середовище з антибіотиком.

Було отримано декілька стабільних рекомбінантних клонів. Наявність інтегрованого гена *RFE1_Dh* в геномі трансформантів було підтверджено ПЛР-реакцією, використовуючи пару специфічних праймерів (ExFw) CGCGGATCCATGATATCTATAAGTAACCCAATG і (ExRew) AAAGTGCAGTCACTTTCTCAACTTTAAACCAAC. Додатково проведено аналіз рівня експресії введеного гена *RFE1_Dh* із використанням сучасного методу ПЛР у реальному часі (RT-PCR) (Рис. 3.3).

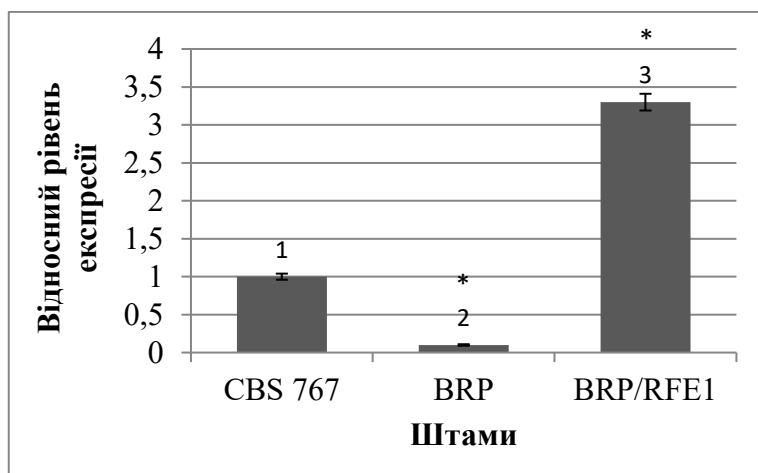


Рис. 3.3. Аналіз відносних рівнів експресії гена *RFE1_Dh* *Debaryomyces hansenii* методом ПЛР в реальному часі (RT-PCR). 1- експресія гена *RFE1_Dh* у дикого штаму *D. hansenii* (CBS 767); 2- у реципієнтного (батьківського) штаму BRP *C. famata*; 3- у рекомбінантного штаму BRP/RFE1 *C. famata*, трансформованого плазмідною з геном *RFE1_Dh*, під контролем промотора *TEF1* *C. famata*. * – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

Одержані дані засвідчили, що рівень експресії введеного гена *RFE1_Dh* у рекомбінантному штамі BRP/RFE1 *C. famata* вищий приблизно в 3,5 раза порівняно з рівнем експресії нативного гена *RFE1* у дикому штамі *D. hansenii*

(CBS 767). Як і очікувалось, у реципієнтного штама BRP *C. famata* не було виявлено експресії цього гена.

У результаті проведеної роботи сконструйовано декілька рекомбінантних штамів-надсинтетиків РФ BRP/RFE1 *C. famata*, що містять ген *RFE1_Dh*, який кодує білок РФ-екскретазу в близького до цього виду дріжджів - *D. hansenii*. Наступним етапом було проведення аналізу флавіногенної активності сконструйованих трансформантів за різних умов вирощування.

3.1.1. Аналіз флавіногенної активності рекомбінантних штамів *Candida famata*, що експресують ген *RFE1_Dh* *Debaryomyces hansenii* у різних середовищах

Продукцію флавінів визначали вирощуванням дріжджів у різних середовищах згідно описаних раніше методик (Dmytruk et al., 2011, Dmytruk et al., 2012). Первинний аналіз флавіногенної активності рекомбінантних штамів BRP/RFE1 *C. famata*, що експресують ген *RFE1_Dh*, проводили після 72 год. вирощування в 10 мл пробірках із 2 мл багатого середовища YPD, використовуючи шейкер (250 об./хв).

Суспензію вирощених клітин використовували для аналізу нагромадження дріжджової біомаси. Далі, клітини осаджували центрифугуванням 3000 об/хв. У культуральній рідині визначали вміст РФ в кожному окремому взірці.

Усі використані в експерименті трансформанти виявили підвищену продуктивність синтезу РФ порівняно із реципієнтним штамом BRP (Рис. 3.4). Одержані дані засвідчили, що трансформанти суттєво відрізняються за продуктивністю синтезу РФ, що можна пояснити різною локалізацією інтегрованої експресійної касети в геномі дріжджів.

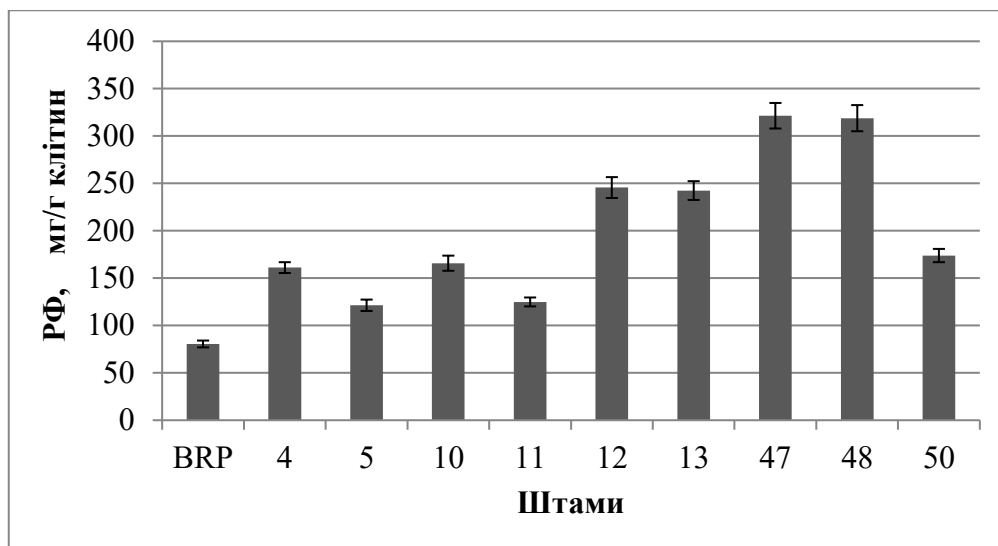


Рис. 3.4. Продуктивність синтезу РФ рекомбінантними штамми BRP/RFE1 *Candida famata* з надекспресованим геном *RFE1 Debaryomyces hansenii*.

Штами BRP/RFE1 47 та 48 характеризувались максимальним, близько 3-х кратним (до 300 мг РФ/г сухих клітин), збільшенням синтезу РФ. Саме їх було обрано для подальшого, більш детального аналізу флавіногенної активності. Реципієнтний штам BRP та похідний від нього рекомбінантний штам BRP/RFE1 47 вирощували у середовищі YPL упродовж 120 годин, аналізуючи рівень продукції флавінів після 24, 48, 72, 78, 96 та 120 год вирощування (Рис 3.5).

Для оцінки флавіногенної активності досліджуваних рекомбінантних штамів аналізували продукцію РФ та нагромадження біомаси упродовж усього часу вирощування.

Забір візріців проводили кожену добу з останнім заміром на 5 добу вирощування.

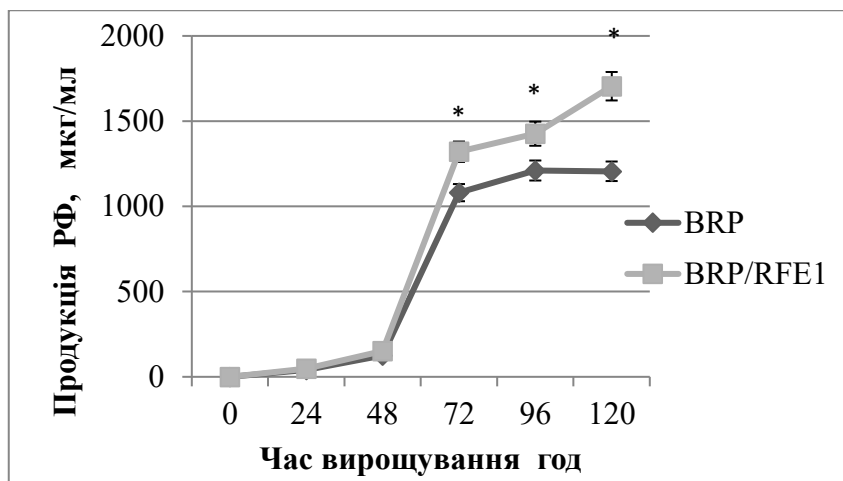


Рис. 3.5. Кінетика продукції РФ рекомбінантними штамами BRP та BRP/RFE1 *Candida famata* вирощеними у середовищі YPL упродовж 120 год. Чорна лінія і круг - продукція РФ реципієнтним штамом BRP; сіра лінія і квадрат - продукція РФ рекомбінантним штамом BRP/RFE1, що надекспресує введений ген *RFE1_Dh Debaryomyces hansenii* під контролем конститутивного промотора *TEF1 C. famata*. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Штам BRP/RFE1 47 характеризувався збільшенням продукції РФ порівняно з батьківським штамом уже на 72 год. вирощування в середовищі YPD та на 120 год досягав 1698 мг/л.

Також аналізували приріст біомаси та продукцію РФ штамами BRP і BRP/RFE1 47 після 72 год росту в бідних глюкозо-мінеральних середовищах: Беркгольдера та Беркгольдера із 0,5% дріжджовим екстрактом порівняно із середовищем YPD (Табл. 3.1). Накопичення біомаси штамами BRP і BRP/RFE1 47 було схожим. Ріст обох штамів був дуже слабким у синтетичному середовищі Беркгольдера без дріжджового екстракту. Штам BRP/RFE1 47 виявив приблизно 2-х кратне збільшення виходу РФ у середовищі Беркгольдера з додаванням 0,5% дріжджового екстракту та YPD (відповідно) порівняно з вихідним штамом BRP.

**Нагромадження біомаси, продукція та продуктивність синтезу
рибофлавіну реципієнтними штамми BRP *Candida famata* і
трансформантом BRP/RFE1 вирощеними у різних середовищах упродовж
72 год**

Середовище	Штам	Біомаса (г/л)	Рибофлавін (мг/л)	Вихід рибофлавіну (мг/г клітин)
YPD	BRP	6,24 ± 0,31	1227,20 ± 61,36	196,66 ± 9,81
	BRP/RFE1	4,34 ± 0,13	1698,51 ± 67,94*	391,36 ± 15,65*
Беркгольдера	BRP	0,29 ± 0,01	81,42 ± 2,44	280,76 ± 8,42
	BRP/RFE1	0,39 ± 0,02	147,12 ± 8,46*	377,23 ± 22,03*
Беркгольдера + дріжджовий екстракт	BRP	5,75 ± 0,32	610,25 ± 20,41	106,12 ± 3,50
	BRP/RFE1	4,75 ± 0,19	915,30 ± 42,10*	192,69 ± 8,86*

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

Результати хроматографічного розділення флавінів засвідчили, що основним флуоресціюючим компонентом у культуральній рідині є саме РФ. Проте слід зазначити також наявність незначних кількостей не ідентифікованих сполук із голубою та фіолетовою флуоресценцією, що найбільш ймовірно представлені птеридинами (Рис. 3.6).

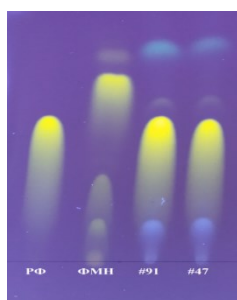
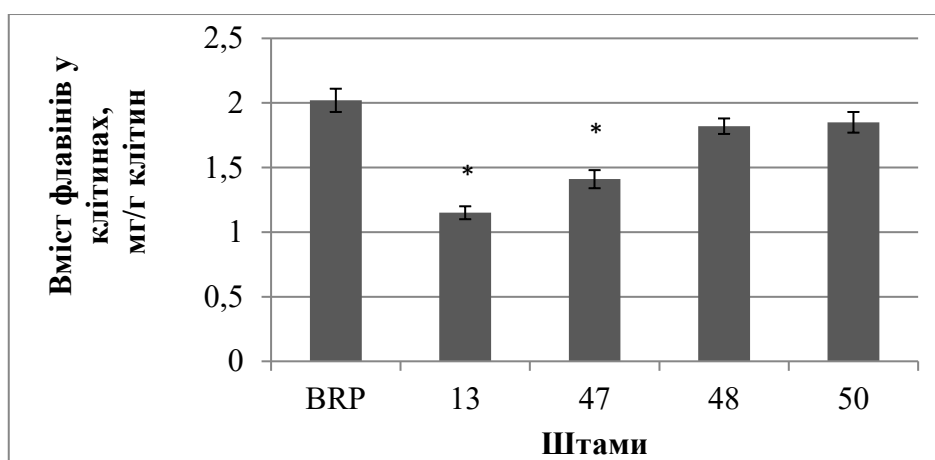


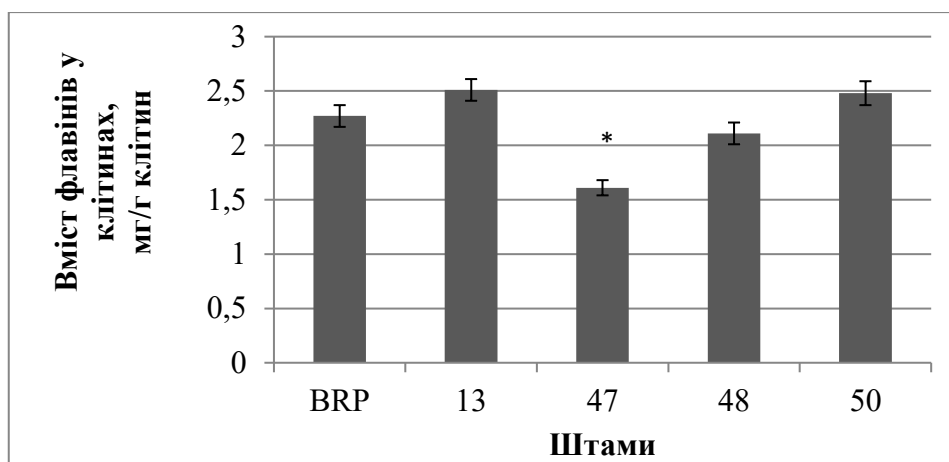
Рис. 3.6. Тонкошарова хроматографія флавінів культуральної рідини штамів BRP та BRP/RFE1 47 *Candida famata* на пластинках Silufol після 144 годин вирощування у середовищі YNB+0,5% дріжджового екстракту.

Також було проведено кількісний аналіз вмісту флавінів у клітинах трансформованих дріжджів. Визначення внутрішньоклітинного вмісту флавінів проводили після 68 год. вирощування у мінеральних середовищах YNB та середовищі Беркгольдера.

Як і очікувалось, вміст флавінів у клітинах трансформантів BRP/RFE1 виявився нижчим порівняно з реципієнтним штамом BRP, оскільки введений ген екскретази повинен забезпечувати саме викид РФ із клітини у культуральне середовище (Рис. 3.7, А, Б).



А



Б

Рис. 3.7. Вміст флавінів у клітинах реципієнтного штаму BRP і рекомбінантних штамів BRP/RFE1 *Candida famata*, що містять введений ген *RFE1_Dh* після 68 год. вирощування у середовищі YNB (А) та Беркгольдера (Б). * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Для прикладу, вміст внутрішньоклітинних флавінів у рекомбінантному штамі BRP/RFE1 47 був у 1,5 раза нижчий порівняно з реципієнтним штамом. Ці результати, додатково підтвердили функціональну активність введеного гена екскретази та його білкового продукту в процесі виходу РФ із трансформованих клітин.

Цікаво, що подальший аналіз BRP/RFE1 47 трансформантів показав підвищення питомої активності ферменту першого етапу синтезу РФ - ГТФ-циклогідролази II, (кодується геном *RIB1*) у 2,2 раза порівняно з реципієнтним штамом BRP (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

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

Штами	Активність ГТФ-циклогідролази, (Од/мг білка) $\times 10^{-5}$	Внутрішньоклітинні флавіни, мг/г сухих клітин
VKMY-9	$3,70 \pm 0,11$	$1,02 \pm 0,04$
BRP	$37,45 \pm 1,31^*$	$2,15 \pm 0,08^*$
BRP/RFE1	$82,62 \pm 4,13^*$	$1,45 \pm 0,05^*$

* – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

Крім цього рівень експресії генів *RFE1* та *RIB1* (ген, що кодує фермент першої реакції біосинтезу РФ) в трансформанта BRP/RFE1 47 також виявились вищими відносно реципієнтного штаму BRP (Табл. 3.3).

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

Гени, Штами	<i>RFE1</i>	<i>RIB1</i>
VKMY-9	-	$1 \pm 0,12$
CBS767	$1 \pm 0,09$	-
BRP	-	$50,08 \pm 8,17^*$
BRP/RFE1	$3,51 \pm 0,68^*$	$91,03 \pm 12,61^*$

* – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

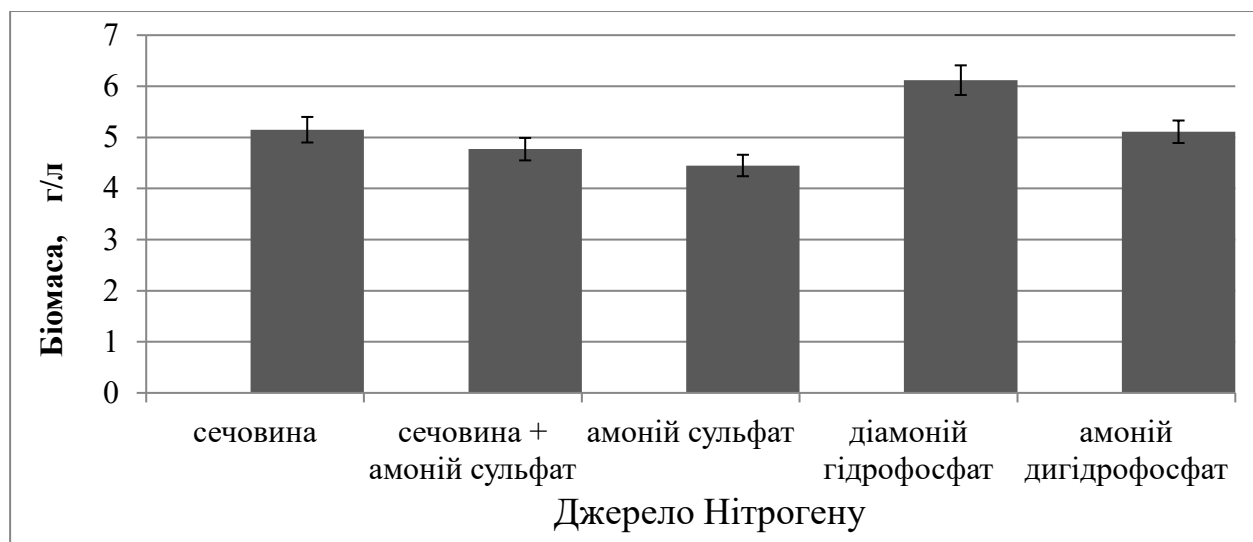
Стандартизацію мРНК проводили відносно мРНК гена *ACT1*.

Збільшення експресії структурного гена флавіногенезу *RIB1* та питомої активності ферменту ГТФ-циклогідролази II в результаті надекспресії дріжджового гена РФ-екскретази *RFE1* виявлено нами вперше. Механізм його виникнення потребує подальшого детального вивчення.

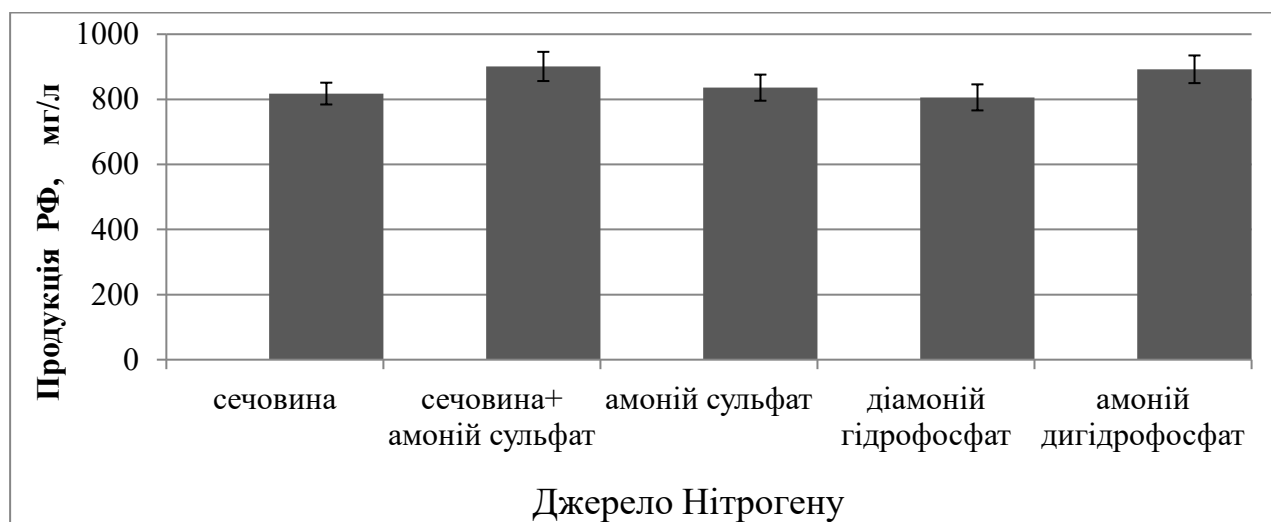
3.1.2. Вплив різних джерел Нітрогену в складі поживного середовища на продукцію рибофлавіну рекомбінантними штамми BRP/RFE1 *Candida famata*

У попередніх роботах (Nafady et al., 2005) було встановлено, що використання різних джерел Нітрогену може суттєво підвищувати швидкість приросту біомаси та синтезу РФ мікроорганізмами. Аналіз флавіногенної активності одержаних трансформантів BRP/RFE1 *C. famata* проводили із використанням середовищ YNB + YE з додаванням 6 різних джерел Нітрогену (3 г/л), таких як сечовина, сечовина + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ та $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Рис. 3.8). Одержані результати продемонстрували, що не усі використані джерела Нітрогену забезпечували високий рівень приросту біомаси та надсинтезу РФ. Найвищий рівень нагромадження біомаси

спостерігали за умов використання діамоній гідрофосфату $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Також продукція РФ виявилась високою за використання комбінації сечовина + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Хоча, загалом, різниця була мінімальною. Також було підтверджено відсутність росту та здатності до синтезу РФ дріжджами у середовищі з нітратами як єдиним джерелом Нітрогену.



А



Б

Рис. 3.8. Біомаса (А) та продукція рибофлавіну (Б) рекомбінантним штамом BRP/RFE1 *Candida famata* у середовищі YNB із 0,5% дріжджовим екстрактом з додаванням різних джерел Нітрогену.

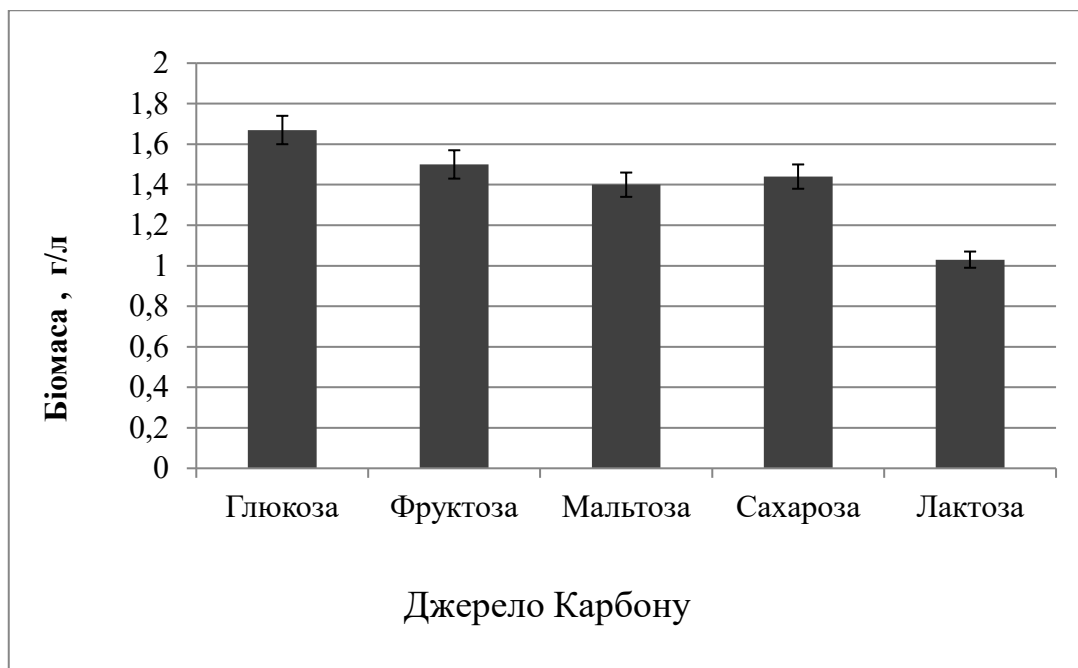
Одержані дані засвідчили можливість застосування згаданих вище нітроген - вмісних сполук у культуральних середовищах для забезпечення нагромадження біомаси та синтезу РФ.

Оскільки більшість використаних сполук є достатньо дешевими та широко використовуються у різних галузях промисловості, їх внесення в склад поживних середовищ додатково знизить вартість мікробного синтезу РФ та забезпечить нарощування дріжджової біомаси у великих кількостях.

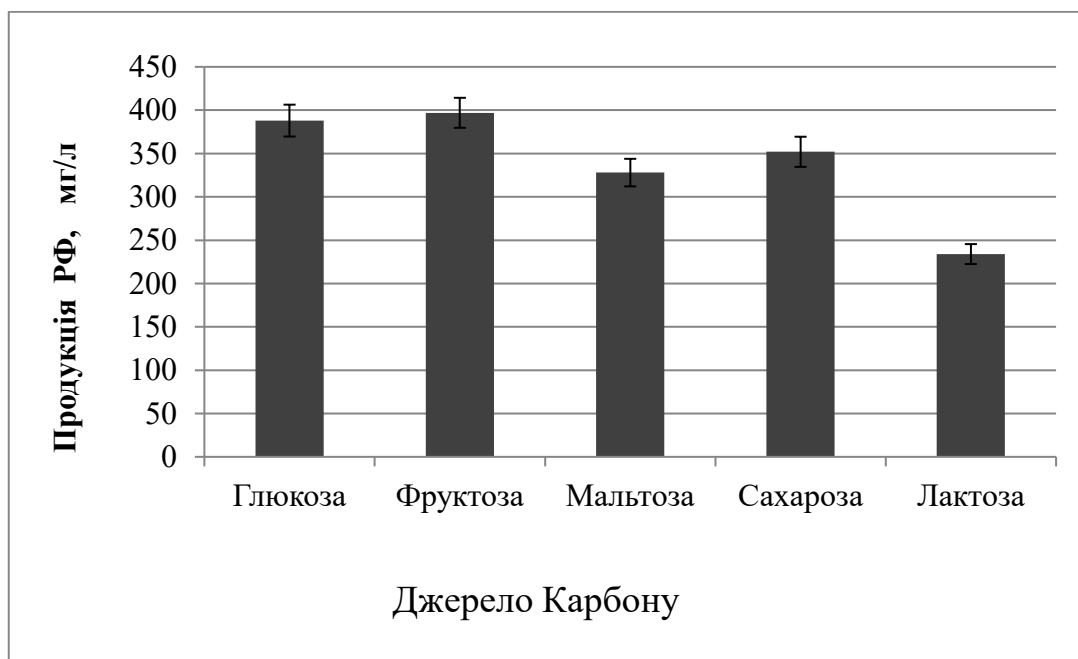
Ще одним важливим чинником забезпечення високого рівня продукції РФ та росту дріжджових надсинтетиків є джерело Карбону в культуральному середовищі. Ми провели аналіз флавіногенної активності трансформанта BRP/RFE1 47 *C. famata* за умов вирощування із різними джерелами Карбону. Як поживне середовище використали YNB без дріжджового екстракту. Відсутність дріжджового екстракту у середовищі призвела до нижчих показників синтезу РФ та росту дріжджів (Рис. 3.9).

Відомо, що за використання в культуральних середовищах різних джерел Карбону ріст та флавіногенез мікроорганізмів може суттєво відрізнятись. Оскільки глюкоза є цінним харчовим продуктом з високою вартістю, використання інших, більш дешевих джерел Карбону дозволить знизити вартість виробництва РФ шляхом мікробного синтезу.

Для аналізу було обрано фруктозу, мальтозу, сахарозу та лактозу. Усі зазначені джерела Карбону присутні у побічних продуктах різних виробництв – переробки фруктової сировини, зерна, виноробства, спиртового та цукрового виробництв, молочної промисловості та ін. Використання культуральних середовища на основі дешевих відходів харчової промисловості дозволить не лише підвищити рентабельність мікробного виробництва РФ але також забезпечити утилізацію промислових відходів та захистити довкілля.



А



Б

Рис. 3.9. Нагромадження біомаси (А) та синтез рибофлавіну (Б) рекомбінантним штамом BRP/RFE1 *Candida famata* у середовищі YNB без дріжджового екстракту з різними джерелами Карбону (2%) упродовж 120 год.

Одержані дані засвідчили активне нагромадження біомаси та синтез РФ надсинтетиком BRP/RFE1 47 *C. famata* у середовищах із всіма використаними джерелами Карбону. Найвищі показники були одержані у середовищі із глюкозою, фруктозою та сахарозою. Нижчі значення продукції РФ спостерігались у лактозо- та мальтозовмісних середовищах. Беручи до уваги, що лактоза є основним джерелом Карбону у дешевому побічному залишку молочної промисловості – сироватці, це додатково підтверджує перспективність використання молочної сироватки (МС) як живильного середовища для промислового виробництва РФ.

3.1.3. Аналіз флавіногенної активності штамів BRP та BRP/RFE1 *Candida famata* у разі використання молочної сироватки як поживного середовища

Наступним етапом досліджень було з'ясування можливості росту та синтезу РФ рекомбінантними штамми *C. famata* у середовищах, основним компонентом яких є побічні продукти молочної промисловості. Попередні дослідження можливості надсинтетиків РФ *C. famata* рости та продукувати РФ у середовищах з різними джерелами Карбону, дозволили виявити здатність дріжджів використовувати як джерела Карбону лактозу. Оскільки лактоза входить до складу МС (Prazeres et al., 2012; Pescuma et al., 2015; Pires et al., 2021), використання цього відходу молочної промисловості у мікробному синтезі дозволить знизити собівартість виробництва РФ.

Ми провели детальний аналіз здатності до росту та надсинтезу РФ сконструйованим рекомбінантними штамми BRP і BRP/RFE1 47 *C. famata* за умов вирощування у різних зразках МС. Було використано сироватку фірми «Mlekovita» (Польща) (хімічний склад МС наведено в розділі 2).

Попередніми дослідженнями встановлено, що оптимальним вмістом лактози у сироватці для росту дріжджів *C. famata* є діапазон від 2,5 до 5%.

Підвищення концентрації сироватки та вмісту лактози до 7,5% і вище призводило до різкого зниження росту та активності флавіногенезу. Хоча у МС із вмістом лактози 2,5 і 5% спостерігався ріст дріжджових клітин, проте його рівень, а особливо здатність синтезувати РФ все ще були суттєво нижчими порівняно з ростом та продукцією РФ у глюкозовмісних середовищах, таких як YNB+YE та YPD. Використання МС із оптимальними концентраціями лактози 2,5 і 5%, а також додатковим внесенням як джерела Нітрогену - амонію сульфату $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ суттєво активувало ріст та флавіногенез дріжджових надсинтетиків. Встановлено, що оптимальною для росту дріжджів кількістю $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у МС є 3 г/л. Активний ріст та синтез РФ дріжджами за оптимальних концентрацій лактози та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ можна було чітко спостерігати візуально (Рис. 3.10).

А



Б

Рис. 3.10. Вирощування штамів дріжджів BRP (А) та BRP/RFE1 *Candida famata* (Б) упродовж 96 год. у молочній сироватці з різною концентрацією лактози (зліва направо – 15, 12, 7,5, 5 і 2,5%) та внесенням 3 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Схожі результати одержані у випадку вирощування рекомбінантного штаму BRP/RFE1 47 *C. famata* на щільній агаризованій сироватці різної концентрації (Рис. 3.11).

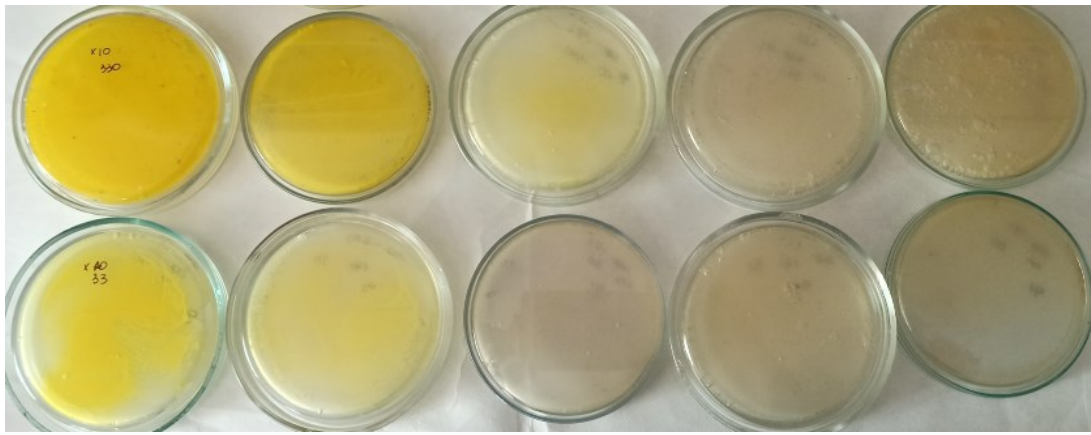
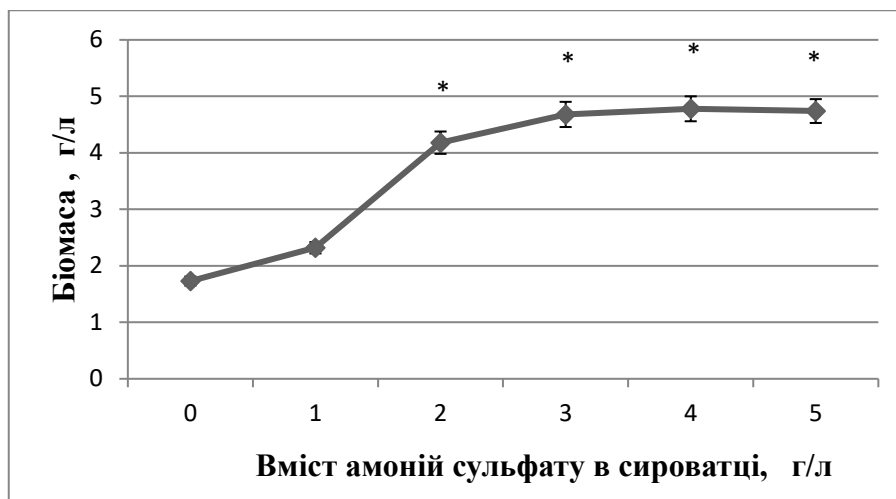


Рис. 3.11. Вирощування штаму дріжджів BRP/RFE1 *Candida famata* упродовж 96 год. на сироватці з різною концентрацією лактози (зліва-направо – 5, 7, 5, 10, 12, 15%) та внесенням 3 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Кількість внесених клітин становила - 330 та 33 мкг на чашку (вверху/внизу, відповідно).

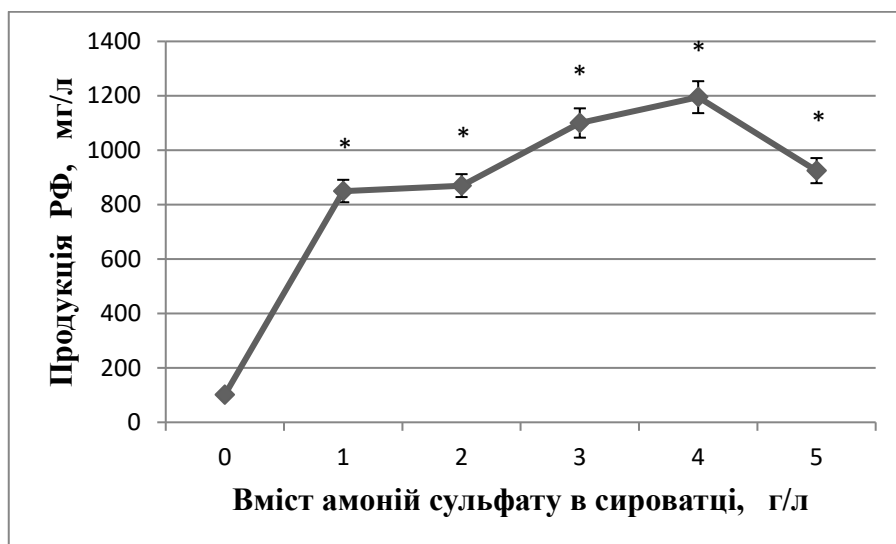
Більш детальний кількісний аналіз підтвердив, що максимальне нагромадження біомаси та продукція РФ штамом BRP/RFE1 47 *C. famata* спостерігали при концентрації $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3-4 г/л у МС (Рис. 3.12).

При цьому, активація флавіногенезу спостерігалась уже при внесенні амоній сульфату в кількості 1 г/л. Оптимальною концентрацією цього джерела Нітрогену в культуральному середовищі є 2-4 г/л. При підвищенні кількості амоній сульфату, спостерігали незначне зниження рівня продукції РФ. Нагромадження дріжджової біомаси також збільшувалось уже при концентрації цього джерела Нітрогену 1 г/л та виходило на плато при його додаванні в середовище у кількостях 4 і 5 г/л.

Підвищення продукції РФ у сироватці за умови внесення дешевого джерела Нітрогену, може слугувати ефективним способом здешевлення виробництва РФ.



А



Б

Рис. 3.12. Нагромадження біомаси (А) та синтез РФ (Б) штамом BRP/RFE1 *Candida famata* за різних концентрацій амонію сульфату (0-5 г/л) у молочній сироватці. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Експериментальним шляхом встановлено, що використання оптимальних умов вирощування дріжджів у МС, а саме: вмісту лактози на рівні 2,5-5% та внесення як додаткового джерела Нітрогену - діамонію сульфату $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у кількості 3 г/л забезпечує значне посилення росту та синтезу РФ до близько 6-8 г клітин та 900-1200 мг РФ на літер, відповідно. Беручи до уваги, використання

як поживного середовища дешевого органічного субстрату та доступної мінеральної добавки, одержані кількості біомаси та РФ можна вважати достатньо перспективними для мікробного виробництва РФ.

Також кількісним аналізом підтверджено, що оптимальним є використання нерозведеної або в двічі концентрованої сироватки (2-5%, відповідно) як живильного середовища (Рис. 3.13).

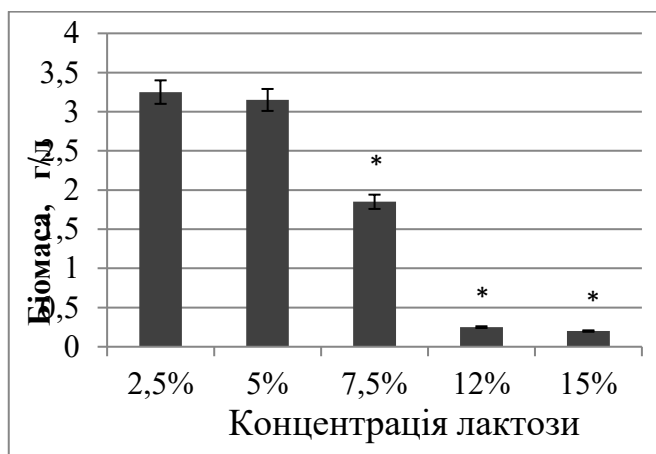
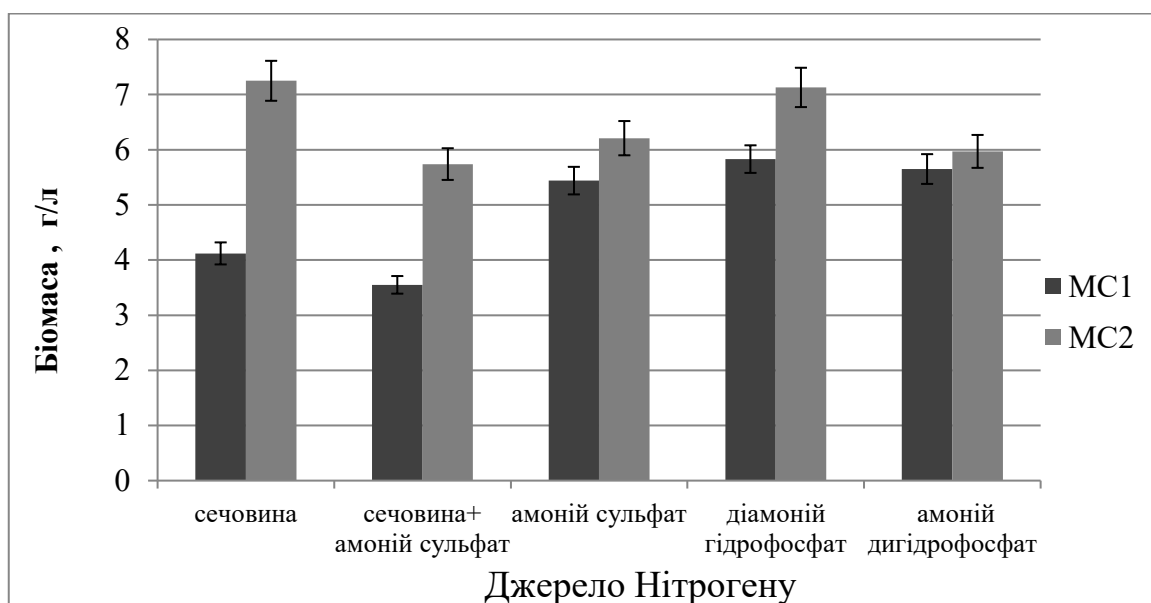


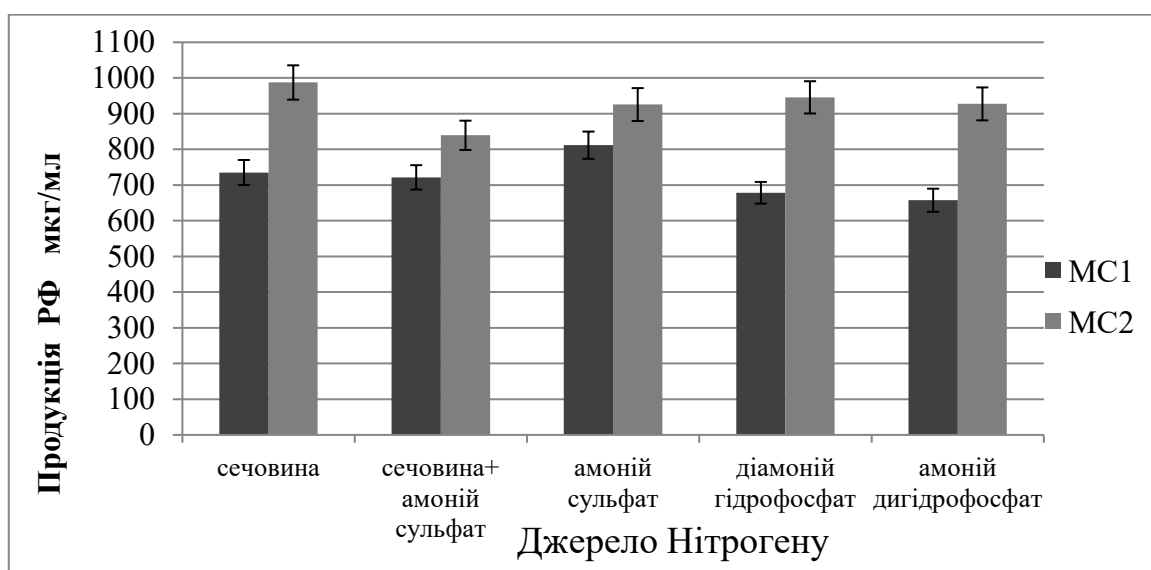
Рис. 3.13. Нагромадження біомаси штаму BRP/RFE1 *Candida famata* за використання як культурального середовища молочної сироватки з різною концентрацією лактози. * – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

Виявлено, що дріжджі *C. famata* не здатні до росту і продукції РФ за використання концентрованої МС із вмістом лактози 12-15%. Додавання $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ також не привело до збільшення нагромадження біомаси дріжджів чи синтезу РФ у концентрований сироватці. Можна припустити, що концентрована сироватка містить сполуки, які у високих концентраціях інгібують ріст дріжджів. Оскільки внесення додаткового джерела Нітрогену у вигляді $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ значно покращує ріст і синтез РФ у використаного штаму дріжджів, нами було проаналізовано також вплив інших нітроген-вмісних сполук: сечовини ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), комбінації сечовини і амоній сульфату

$((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, діамонію фосфату $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ та амонію дифосфату $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (Рис. 3.14).



А



Б

Рис. 3.14. Нагромадження біомаси (А) та продукція рибофлавіну (Б) BRP/RFE1 *Candida famata* за вирощування у молочній сироватці із 2,5 % лактози та додаванням різних джерел Нітрогену упродовж 96 год.

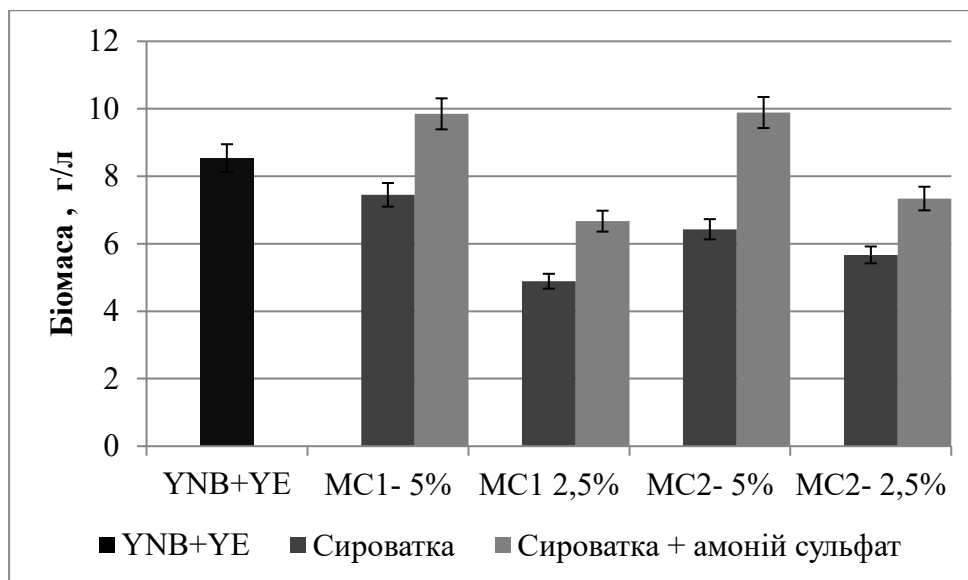
Також збільшення нагромадження дріжджової біомаси та продукції РФ спостерігалось за умов використання усіх видів нітрогеновмісних сполук. Беручи до уваги їх низьку вартість, доступність, а також низький рівень токсичності, ці сполуки можуть слугувати перспективними мінеральними добавками в складі культуральних середовищ для мікробного виробництва РФ.

Підібрані оптимальні умови вирощування були застосовані для тестування здатності до росту та синтезу РФ штамом BRP/RFE1 47 на двох видах МС наданих польською фірмою «Mlekovita». Для порівняння, було використано глюкозовмісне середовище YNB+YE. Додавання $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, як додаткового джерела Нітрогену до сироватки забезпечило вищі рівні біомаси та продукції РФ порівняно з результатами вирощування у середовищі YNB+YE (Рис. 3.15).

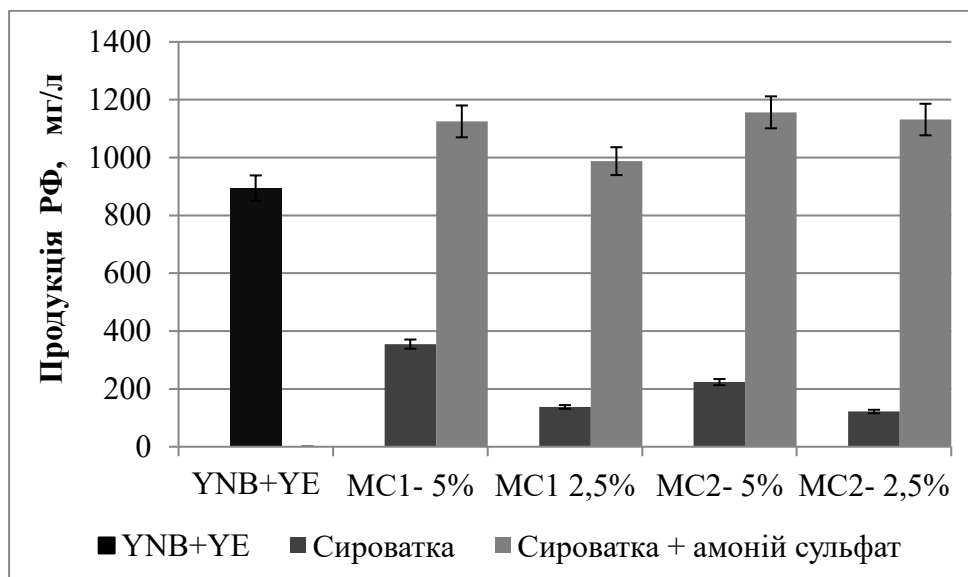
Обидва використані взірці сироватки показали схожі рівні активності флавіногенезу у різних штамів дріжджів *S. famata*. Незначну відмінність у рівнях продукції РФ та нагромадженнях біомаси дріжджів у двох різних партіях використаної сироватки можна пояснити певними відмінностями їх хімічного складу.

Загалом, усі досліджені партії сироватки, отримані з різних підприємств забезпечували високий рівень продукції РФ штамми *S. famata*, що свідчить про перспективність використання МС для отримання препаратів вітаміну В₂. Налагодження промислового виробництва РФ з використанням дешевої МС є ефективним способом підвищення рентабельності цього виробництва. Також МС може бути використана як культуральне середовище для отримання шляхом мікробного синтезу інших корисних флавінових сполук –ФМН, ФАД, АФ та ін.

Важливим є те, що рівень продукції РФ та нагромадження біомаси дріжджів за умови культивування у дешевій МС із додаванням дешевого амоній сульфату є схожими, а у випадку з використанням МС із вмістом лактози 5% - навіть вищим порівняно з дорогим середовищем YNB з доданим дріжджовим екстрактом (0,2%).



А

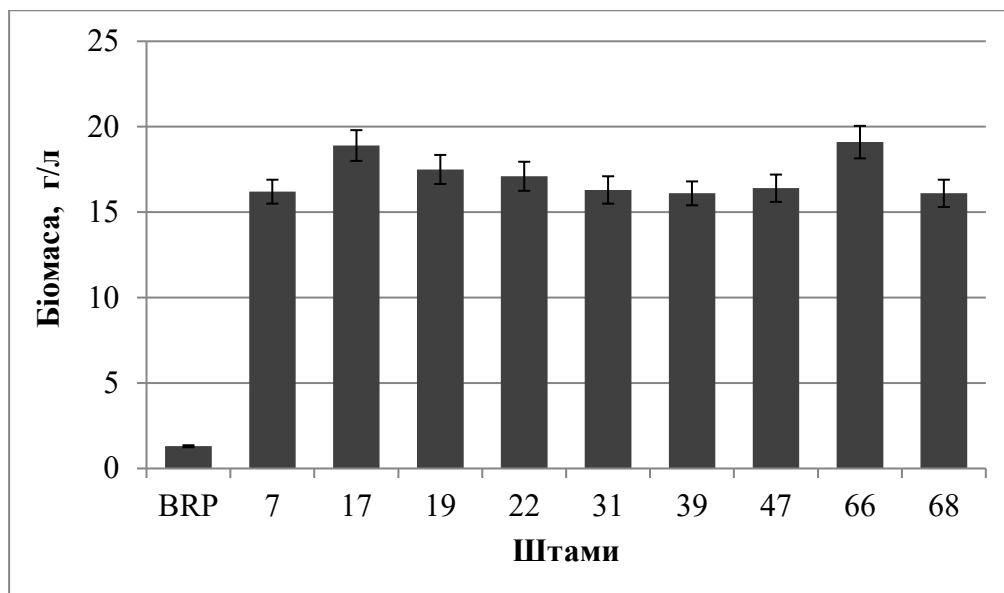


Б

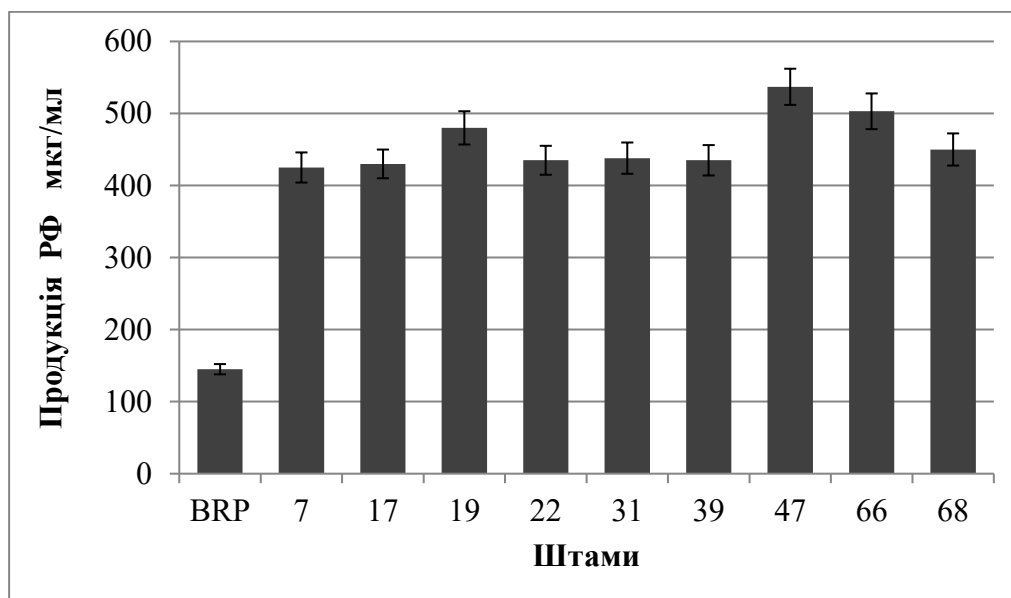
Рис. 3.15. Нагромадження біомаси (А) та продукція рибофлавіну (Б) дріжджами BRP/RFE1 *Candida famata* за умов вирощування у YNB+YE та молочній сироватці з вмістом лактози 2,5 та 5 %. Для вирощування використовували сироватку з або без додавання $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ упродовж 120 год.

Отримані дані підтверджують можливість використання МС як ефективного та дешевого культурального середовища, а також необхідності внесення додаткового джерела Нітрогену в МС.

Як вже згадувалось, для економії витрат на транспортування промислові виробники використовують концентрування МС, що зменшує відповідно об'єм та вагу вантажу. Тому отримання дріжджових мутантів здатних до росту на концентрований МС є перспективним напрямком здешевлення транспортування цього субстрату для мікробного виробництва РФ у концентрований формі. З цією метою ми одержали ряд мутантів на основі штаму *C. famata* BRP методом УФ- опромінення. Було відібрано низку колоній, що володіли підвищеною здатністю до росту та продукції РФ у МС із 12% лактозою (Рис. 3.16).



А



Б

Рис. 3.16. Нагромадження біомаси (А) та продукція рибофлавіну (Б) штамом BRP та опроміненими ультрафіолетом мутантами *Candida famata* вирощеними у концентрованій сироватці (12% лактози) із додаванням амонію сульфату упродовж 96 годин.

Виявлено 10- кратне збільшення нагромадження біомаси УФ-мутантів та збільшення в 3 рази продукції РФ порівняно із батьківським штамом BRP у 12% сироватці. Спроби отримати УФ - мутанти *C. famata* із здатністю до росту та синтезу РФ у сироватці із 15% лактози не були успішними.

Використовуючи середовище YNB+YE із 12-15% лактозою, як єдиним джерелом Карбону засвідчили, що сам по собі, високий вміст лактози не інгібує росту дріжджів. Сполуки МС, що у підвищених концентраціях спричиняють пригнічення росту та флавіногенезу досліджених мікроорганізмів залишаються не відомими. Незважаючи на кращий ріст та вищий рівень продукції РФ УФ-мутантами у сироватці з 12 % лактози порівняно із батьківським штамом BRP *C. famata*, дані показники суттєво нижчі порівняно із накопиченням біомаси та синтезом РФ дріжджами у МС із 2-5% лактози.

Виходячи з одержаних даних, можна запропонувати новий склад ефективного поживного середовища, створеного на основі відходів молочної промисловості – МС із додаванням широкого спектру нітроген- вмісних низькомолекулярних неорганічних сполук, що забезпечить активне нагромадження біомаси та високий рівень синтезу цільового продукту - РФ. Такий підхід дозволить суттєво знизити собівартість виробництва та забезпечить додатковий захист довколишнього середовища.

3.1.4. Аналіз флавіногенної активності рекомбінантних штамів *Candida famata* які експресують ген *RFE1_Dh Debaryomyces hansenii* із використанням гліцеролу як джерела Карбону

Використання основного відходу виробництва біопалива - гліцеролу, як альтернативного джерела Карбону у промисловому мікробіологічному виробництві, є одним із важливих напрямків здешевлення культуральних середовищ мікроорганізмів та захисту довкілля (Da Silva et al., 2009, Semkiv et al., 2020).

Ми виявили, що рекомбінантний штам дріжджів BRP/RFE1 47 *C. famata*, який експресує ген *RFE1_Dh*, здатний рости і синтезувати невелику кількість (до 100 мг/л) РФ у середовищі YNB + (NH₄)₂SO₄ з очищеним гліцеролом (2 %) як джерелом Карбону (Рис. 3.17).

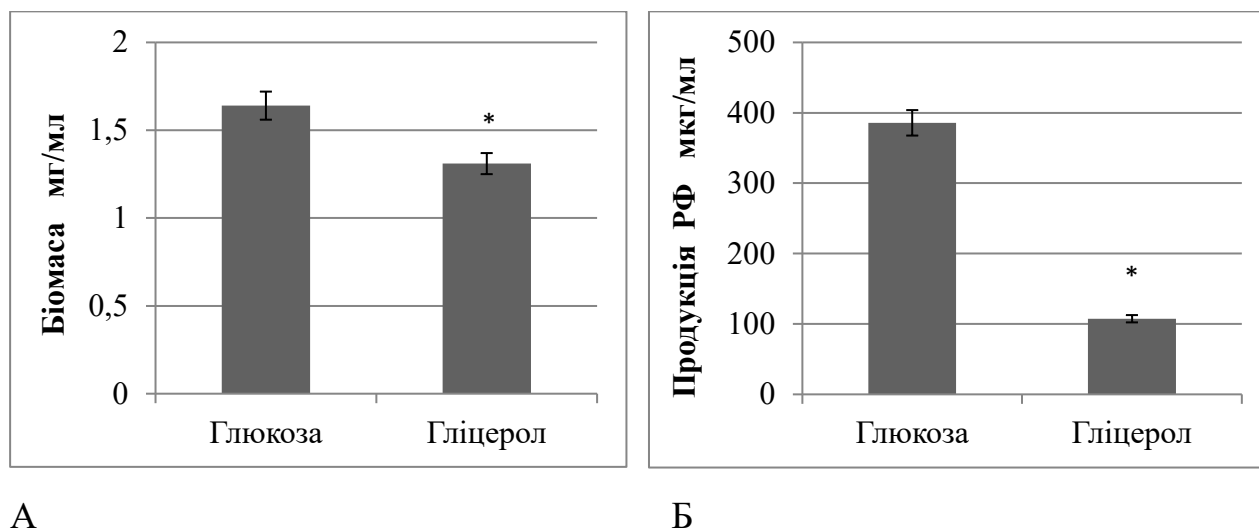


Рис. 3.17. Нагромадження біомас (А) і продукція рибофлавіну (Б) рекомбінантним штамом дріжджів BRP/RFE1 *Candida famata*, що експресує ген *RFE1_Dh*, у середовищі з очищеним гліцеролом як джерелом Карбону.

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

У наступному експерименті, ми використали як джерело Карбону в середовищі вирощування - технічний неочищений гліцерол, який є відходом виробництва дизелю, очищення якого є фінансово не рентабельним процесом (Santibanez et al., 2011). Однак, у середовищі із неочищеним гліцеролом клітини дріжджів *C. famata* були не здатними до росту та продукції РФ, ймовірно, через велику кількість токсичних сполук та інших домішок. Зниження концентрації гліцеролу в середовищі з 2 до 0,5 % теж не привело до позитивних результатів. Для зменшення негативного впливу токсичних домішок у технічному гліцеролі, ми використали глауконіт – мінерал класу силікатів, який має сорбційні властивості щодо нафтопродуктів, важких металів, радіонуклідів і поглинає

цілий ряд цитотоксичних сполук: фенол, фосфорорганічні, хлор-органічні і сульфуро-вмісні пестициди (Smith et al., 1996). 1 мг/мл цього мінералу додавали до середовища з неочищеним гліцеролом і вирощували клітини упродовж 7 діб.

Найвищу біомасу дріжджі BRP/RFE1 47 *C. famata* нагромаджували за умов вирощування в середовищі YNB + YE + (NH₄)₂SO₄ спостерігався з додаванням очищеного гліцеролу та глауконіту.

Внесення глауконіту до середовищ з очищеним та неочищеним гліцеролом сприяє росту дріжджів порівняно з середовищами без глауконіту. Проте, продукції РФ в середовищі з неочищеним гліцеролом та глауконітом не виявлено (Рис. 3.18).

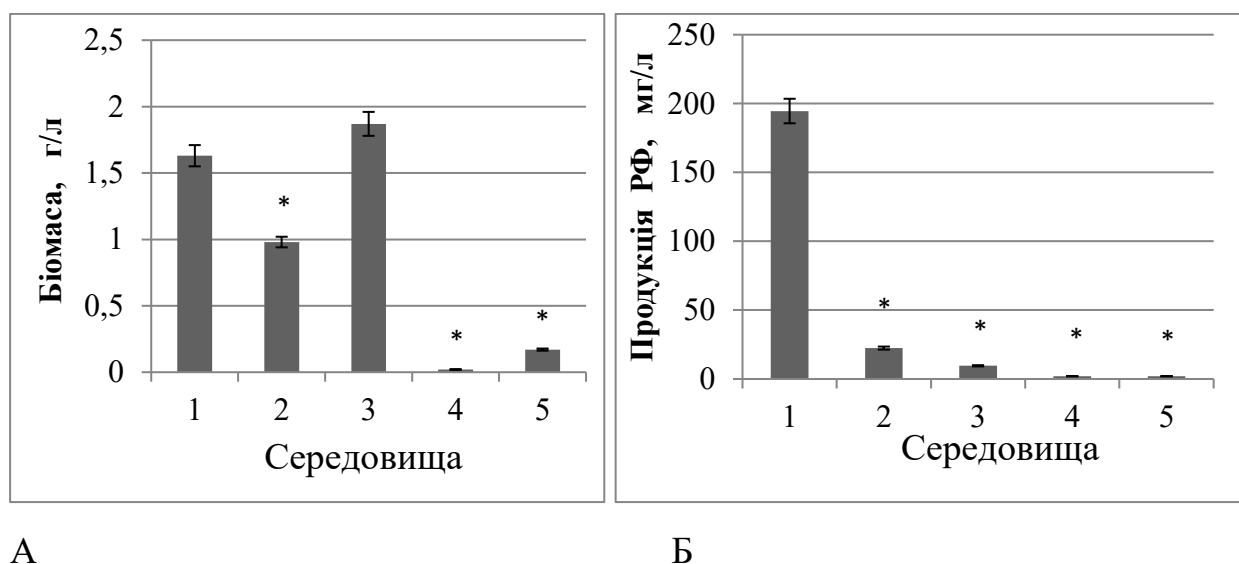


Рис. 3.18. Нагромадження біомаси (А) та продукція рибофлавіну (Б) штамом дріжджів BRP/RFE1 *Candida famata* за вирощування у середовищі YNB + (NH₄)₂SO₄ + гліцерол з (без) додавання глауконіту. 1-2 % глюкоза, контроль; 2-0,5 % очищений гліцерол; 3-0,5 % очищений гліцерол + глауконіт; 4-0,5 % неочищений гліцерол; 5-0,5 % неочищений гліцерол + глауконіт.

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

У попередньому експерименті вміст очищеного гліцеролу становив 2 %, що забезпечило вищий рівень продукції РФ у порівнянні із використанням гліцеролу в концентрації 0,5%. Наступним етапом була спроба одержати

мутанти із підвищеною здатністю до росту та продукції РФ у середовищах із технічним гліцеролом. Для цього було проведено УФ опромінення штамів надсинтетиків BRP і BRP/RFE1 47 *C. famata*. Суспензію дріжджових клітин (0,3 од. опт. густини) опромінювали упродовж 25 сек та висівали на агаризоване середовище YNB + YE з неочищеним технічним гліцеролом (0,5 або 2%). Результати аналізів засвідчили відсутність колоній на середовищі з технічним гліцеролом.

Підсумовуючи одержані дані, можна запропонувати використання як альтернативного джерела Карбону в поживних середовищах для нарощування біомаси та синтезу РФ дріжджами *C. famata* очищений гліцерол. Причини відсутності росту на неочищеному гліцеролі потребують подальшого вивчення. Необхідні подальші дослідження для з'ясування відсутності росту дріжджів на середовищі з неочищеним гліцеролом.

3.1.5. Розробка лабораторного регламенту отримання рибофлавіну із використанням сконструйованого штаму BRP/RFE1 *Candida famata*

Необхідною умовою ефективного використання дріжджових надсинтетиків РФ у промисловому виробництві є здатність до швидкого росту та високого рівня продукції цільового продукту.

Ці характеристики досягаються не лише за рахунок внесення певних генетичних модифікацій у штами продуценти та оптимізації складу середовища вирощування, але і використанням оптимальної схеми вирощування. Для пришвидшення нагромадження біомаси та досягнення високого рівня продукції РФ одержаним нами рекомбінантним штамом BRP/RFE1 47 *C. famata*, було апробовано 2-х етапний спосіб вирощування.

На першому етапі дріжджову біомасу нарощували у культуральному середовищі, що отримало назву «Опт1» і забезпечувало оптимальні умови для швидкого росту. Після чого, одержану кількість клітин (3, 5 та 10 мг) переносили у середовище «Опт2» для швидкого та активного синтезу цільового

продукту завдяки оптимальному складу та високому вмісту глюкози (70 г/л) (Рис. 3.19).

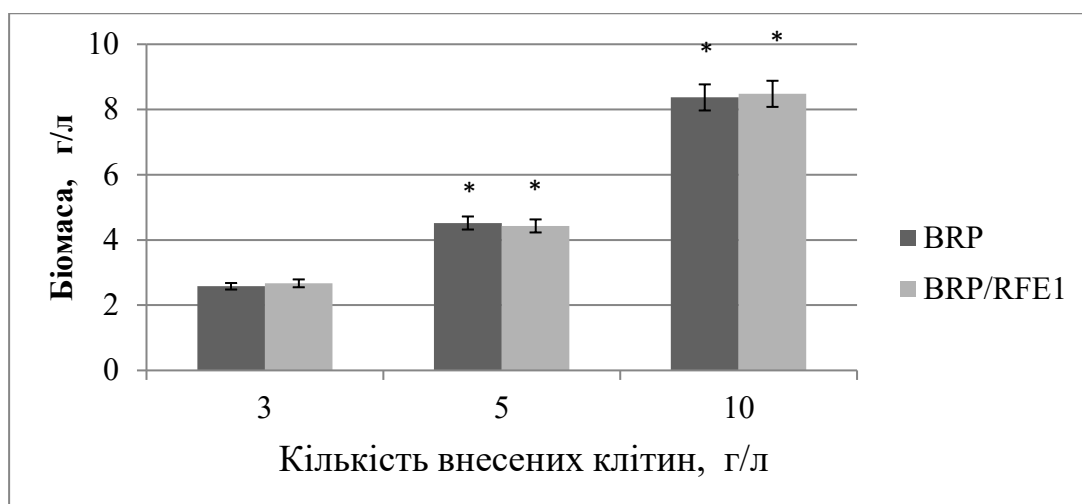


Рис. 3.19. Експериментальна схема лабораторного регламенту вирощування дріжджових надсинтетиків РФ BRP та BRP/RFE1 *Candida famata* в оптимізованих середовищах.

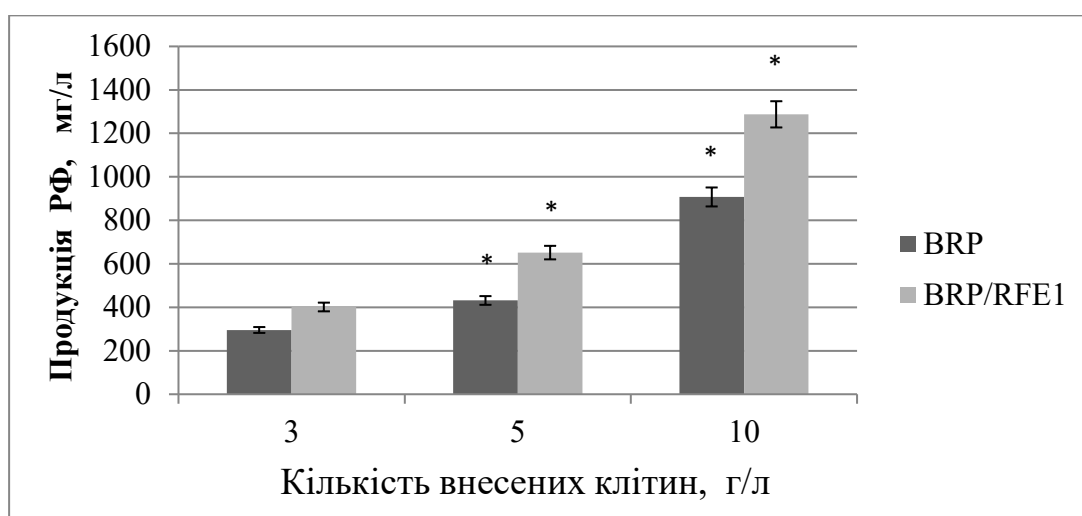
Одержані результати засвідчують пряму позитивну кореляцію між кількістю внесених клітин із середовища Опт1 у середовище Опт2 та біомасою і продукцією РФ на 70-ту годину вирощування у використаних діапазонах. За цих умов вирощування біомаса та продукція РФ збільшується (Рис. 3.20).

Використання високих концентрацій глюкози в культуральних середовищах дозволяє значно підвищити рівень продукції РФ та швидкість росту дріжджових клітин. Проте беручи до уваги високу вартість глюкози та її харчову цінність, цей спосіб можна використовувати лише для проведення науково-дослідницької роботи у лабораторіях.

Оскільки, як згадувалось раніше, дріжджові клітини активно ростуть та синтезують РФ у середовищах із іншими джерелами Карбону, такими як фруктоза, мальтоза, сахароза та лактоза, запропонований підхід можна використати для підвищення ефективності мікробного виробництва РФ за умови використання дешевих відходів харчової промисловості, що містять ці джерела Карбону.



А



Б

Рис. 3.20. Нагромадження біомаси (А) і продукція рибофлавіну (Б) дріжджів BRP та BRP/RFE1 *Candida famata* у середовищі Опт2 після 70 год. вирощування. Кількість внесених клітин у середовище Опт2 становило 3, 5 та 10 г/л, відповідно. * – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

Крім цього, аналіз флавіногенної активності додатково засвідчив вищий рівень продукції РФ одержаним рекомбінантним штамом BRP/RFE1 47 *C. famata* порівняно із реципієнтним штамом BRP, який становить більше 1,2 г/л РФ за 70 годин вирощування.

Зменшення тривалості вирощування та забезпечення високого рівня продукції РФ завдяки використаному технологічному підходу дозволить знизити витрати та час виробництва вітаміну В₂ в промисловості.

Ще одним способом знизити собівартість виробництва РФ із використанням МС як поживного середовища, є можливість вирощування дріжджових надпродуцентів у нестерильній МС.

Описану вище схему вирощування було взято за основу для вирощування дріжджів у нестерильній МС. У досліді використовували сироватку ПК+N із вмістом лактози у середовищі (2,5; 5 і 7,5 %). У середовище із нестерильною сироваткою вносили велику кількість клітин так, щоб початкова біомаса становила 5-6 мг/мл. Схема вирощування наведена на рисунку 3.21.

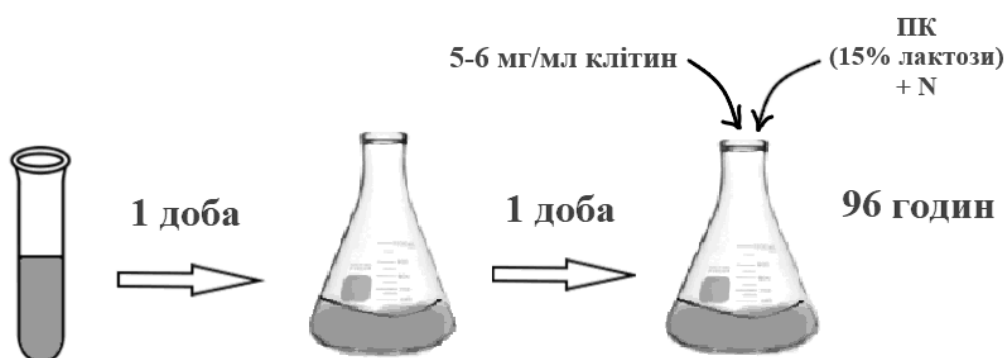
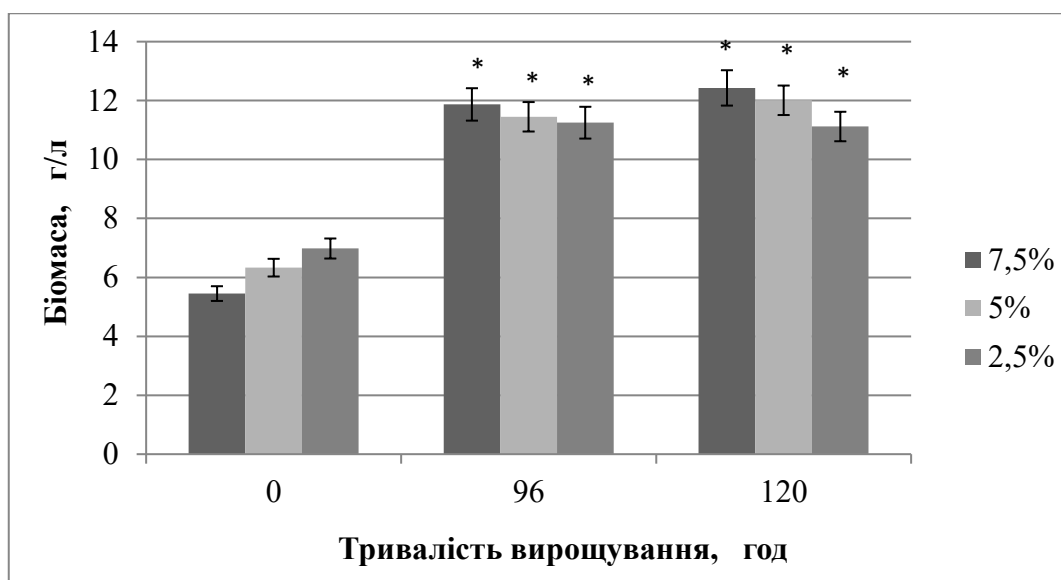
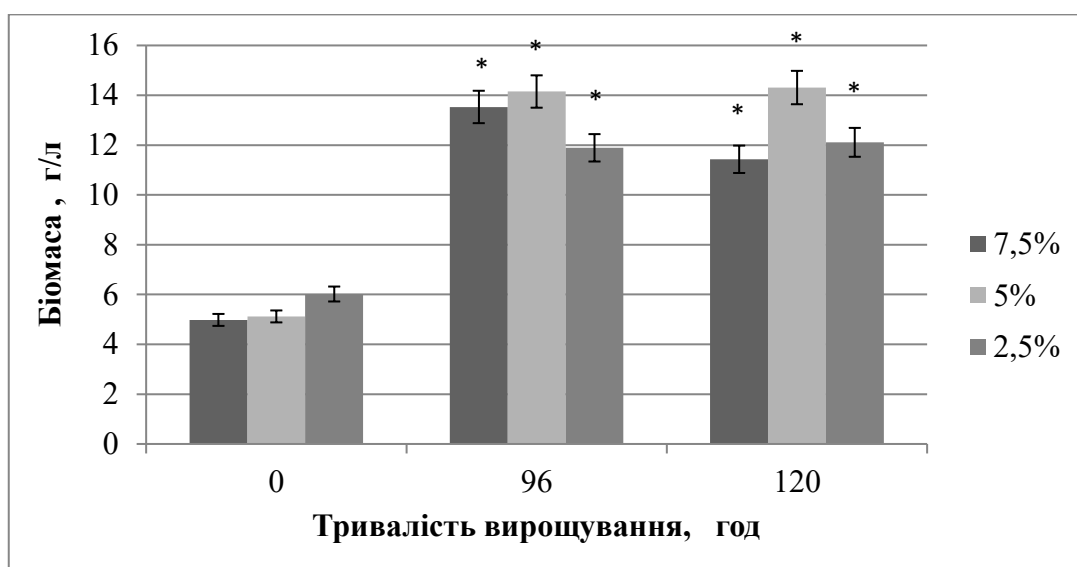


Рис. 3.21. Схема вирощування дріжджів BRP та BRP/RFE1 *Candida famata* у середовищі з молочною сироваткою + (NH₄)₂SO₄. Молочна сироватка польського виробництва «Mlekovita».

Росту клітин дріжджів після 96 і 120 години вирощування не спостерігали, а концентрація лактози у середовищі (від 2,5 до 7,5%) майже не впливала на нагромадження біомаси, яка коливалась в межах 11-12 г/л для штаму BRP і 13-14 г/л - для штаму BRP/RFE1 47 (Рис. 3.22; А, Б).



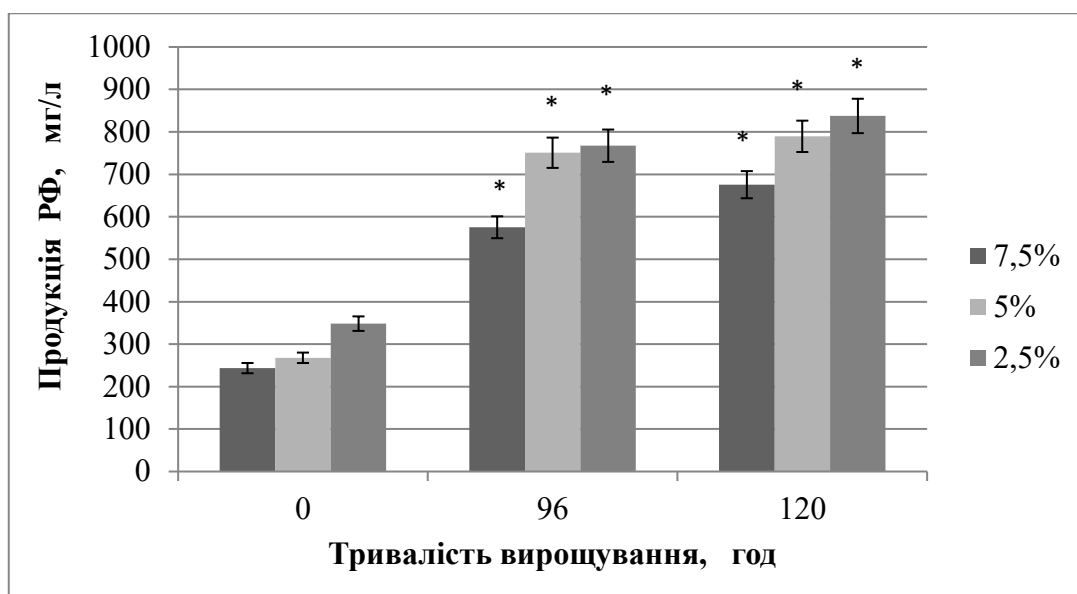
А



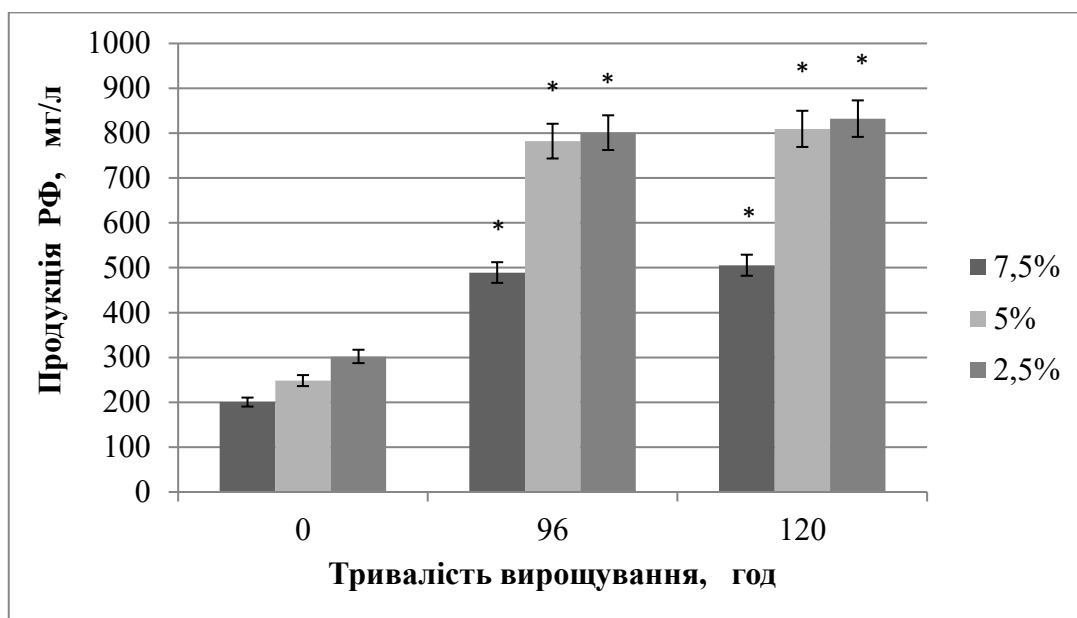
Б

Рис. 3.22. Нагромадження біомаси дріжджів BRP (А) BRP/RFE1 *Candida famata* (Б) у середовищі із нестерильною сироваткою + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з різною концентрацією лактози (2,5; 5 і 7,5%).* – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Концентрація РФ у сироватці із 2,5; 5 і 7% лактози була схожою та при культивуванні до 96 та 120 год (Рис. 3.23; А, Б).



А



Б

Рис. 3.23. Вміст рибофлавіну в культуральній рідині за вирощування дріжджів BRP (А) і BRP/RFE1 *Candida famata* (Б) у середовищі із нестерильною сироваткою + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з різним вмістом лактози (2,5; 5 і 7,5%). * – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

Ці результати підтверджують можливість вирощування дріжджів *C. famata* для продукції РФ у нестерильних умовах біотехнологічного виробництва, незважаючи на наявність поодиноких клітин бактерій (ймовірно,

молочнокислих) в культуральній рідині, що спостерігали з використанням світлової мікроскопії. Також можна скоротити тривалість вирощування дріжджів у кінцевому сироватковому середовищі до 96 годин, замість 120 год, оскільки приріст біомаси і синтез РФ після 96 год вирощування за цей час є дуже незначним. Це покращує передумови для підбору оптимальних умов використання нестерильної сироватки для мікробного синтезу РФ.

3.2. Конструювання штамів дріжджів *Candida famata* із надекспресією гена транскрипційного фактора Sef1 під контролем лактозо-індуцибельного промотора *LAC4*

Інтеграція додаткової копії гена транскрипційного фактора Sef1 під контролем промотора *TEF1* *C. famata* в геном надпродуцента РФ AF-4 *C. famata* призводить до посилення продукції РФ та зростання стабільності за ознакою «надсинтез РФ» (Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2014). Ми припустили, що введення додаткової копії власного гена *SEF1* *C. famata* в геном найкращих штамів - надсинтетиків РФ *C. famata* призведе до подальшого збільшення синтезу РФ. Особливої уваги заслуговує використання лактозо-індуцибельного промотора, що забезпечить високий рівень експресії введеного гена за умов вирощування у молочній сироватці - дешевого побічному продукті молочної промисловості (Prazeres et al., 2012; Pescuma et al., 2015; Pires et al., 2021).

Для досягнення цієї мети нами було заплановано введення додаткової копії власного гена транскрипційного фактора Sef1 *C. famata* під контролем лактозо-індуцибельного промотора гена *LAC4* (ген кодує β -галактозидазу (Corredor et al., 2003) у селекціоновані раніше найкращі надсинтетики РФ *C. famata* BRP, BRPI (Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2020) та BRP/RFE1.

3.2.1. Конструювання штамів дріжджів *Candida famata* які експресують ген *SEF1* *C. famata* під контролем промотора *LAC4* *C. famata*

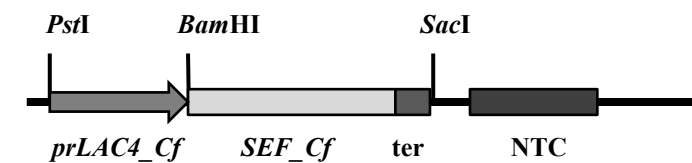
Нами було сконструйовано плазмиду, що містить ген *SEF1* *C. famata* під контролем лактозо-індуцибельного промотора гена *LAC4* цього ж виду дріжджів.

Промотор *LAC4* *C. famata* ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів Ko1068: TTTGGGGCCCTATATAGAGACAATAAGACCAG і Ko1069: CGCGGATCCGTTGAGTATATATCTATTACTTC з геномної ДНК *C. famata* VKMY-9 (Всеросійська колекція мікроорганізмів, Пущино, Росія). Фрагмент ампліфікованої ДНК містив сайти ендонуклеаз *ApaI/BamHI*. Далі, промотор *LAC4* *C. famata* був введений у плазмиду носій, що містила попередньо клоновані гени транскрипційного фактора *sef1* *C. famata* та стійкості до норзеотрицину (NTC) (Andreieva et al., 2020). Отриману рекомбінантну плазмиду назвали pNTC/prLAC4-SEF1. Для проведення трансформації дріжджів *C. famata* плазмиду лінеаризували ендонуклеазною *XhoI* та вводили в клітини методом електропорації, описаним раніше (Voronovsky et al., 2002). Інтеграцію плазмиди pNTC/prLAC4-SEF1 в геномі дріжджових клітин виявляли методом ПЛР-аналізу (Рис. 3.24).

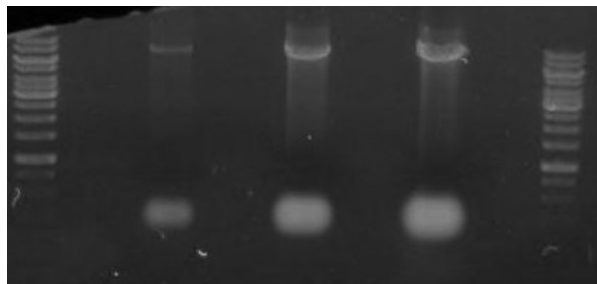
Трансформація клітин дозволила отримати значну кількість колоній після їх вирощування на селективному середовищі з норзеотрицином.

Відібрані колонії пересівали на агаризоване середовище із антибіотиком. Після 2-3 днів росту, клітини лізували та виділяли геномну ДНК. Проведений ПЛР-аналіз дозволив виявити низку рекомбінантних штамів, які містили введену плазмиду.

Отримані колонії використовували для подальших досліджень флавогенної активності та нагромадження дріжджової біомаси за умов культивування у різних живильних середовищах.



А



Б



В

Рис. 3.24. Плазмідa pNTC/prLAC4-SEF1, що містить ген транскрипційного фактора *sef1* *Candida famata*. А. Схема плазміди: Ген *SEF1* *Candida famata* (світло-сірий блок), під контролем лактозо-індукційного промотора гена *LAC4*, що кодує β -галактозидазу (сірий блок). Для селективного відбору клонів використовували ген стійкості до норзеотрицину (темно-сірий блок) (розмір плазміди - 8458 п.н.). Плазмідa введена шляхом електропорації в штами AF-4 та BRP *Candida famata*. Б. Лінеаризована плазмідa pNTC/prLAC4-SEF1 шляхом ендонуклеазного розщеплення ферментом *XhoI*. В. Аналіз наявності введеної плазміди pNTC/prLAC4-SEF1 у геномі трансформованих штамів AF-4 та BRP *C. famata* проводили методом ПЛР. Для ампліфікації використовували праймери специфічні до промоторної ділянки *LAC4* та гена *SEF1*, відповідно.

Конструювання нових рекомбінантних штамів проводили використовуючи чотири реципієнтні штами *C. famata* із найкращими показниками продукції РФ та генетичної стабільності (Табл. 3.4., також див. розділ 3).

Таблиця 3.4

**Реципієнти рекомбінантні штами *Candida famata*
використані для введення плазмиди pNTC/prLAC4-SEF1**

Штам	Генетичні модифікації	Літературні джерела
AF-4	Одержаний шляхом класичного мутагенезу та селекції.	(Dmytruk et al., 2011)
BRP	(названий як BRP - <u>B</u> est <u>R</u> iboflavin <u>P</u> roducer); AF-4 із додатково введеними копіями генів <i>SEF1</i> , <i>RIB1</i> і <i>RIB7</i> <i>C. famata</i> (AF-4/SEF1/RIB1/RIB7).	(Dmytruk et. al., 2011)
BRP/RFE1	BRP із введеним геном РФ- екскретази (<i>RFE1</i>) <i>D. hansenii</i> під контролем <i>TEF1</i> промотора;	(Дана робота)
BRPI	BRP із введеними модифікованими генами біосинтезу пуринів <i>de novo</i> <i>PRS3</i> та <i>ADE4</i> (BRP/PRS3m/ADE4m)	(Dmytruk et al., 2020)

Частота трансформації становила близько 50 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК. Наявність введеної плазмиди pNTC/prLAC4-SEF1 у геномі трансформантів перевіряли за допомогою ПЛР. Підтверджені ПЛР поодинокі колонії стабілізували почерговим вирощуванням на не селективних та селективних середовищах без, та з антибіотиком норзеотрицином.

Рівень експресії інтегрованої плазмиди в геномі дріжджів був визначений сучасним методом ПЛР в режимі реального часу (RT-PCR). Одержані дані засвідчили збільшення рівня експресії плазмиди в 1,7-1,8 раза за вирощування у лактозовмісних середовищах у порівнянні з використаним середовищем із глюкозою (Табл. 3.5).

Таблиця 3.5

ПЛР аналіз у реальному часі відносного рівня експресії гена *SEF1*

Штам та тип Карбону в середовищі	експресія гена <i>SEF1</i> (y.o)
AF-4/prLAC4-SEF (глюкоза) / (глюкоза)	1.00
AF-4/prLAC4-SEF (лактоза) / (глюкоза)	1.74 ± 0.056*
AF-4/prLAC4-SEF (сироватка) / (глюкоза)	1.84 ± 0.159*

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

Серед підтверджених за допомогою ПЛР та стабілізованих трансформантів шляхом попереднього аналізу флавіногенної активності, було обрано декілька штамів із найвищою продукцією РФ і використано для подальших досліджень.

3.2.2. Флавіногенна активність рекомбінантних штамів *Candida famata* які експресують додаткову копію гена *SEF1* під контролем промотора *LAC4* за різних умов вирощування

Аналізували здатність відібраних рекомбінантних штамів *C. famata* до росту та продукції РФ із використанням синтетичних середовищ YNB з додаванням 0,2% дріжджового екстракту, 2% - або 5% глюкози, лактози та сироватки (5% лактози) з амоній сульфатом як джерелом Нітрогену.

Рівень продукції РФ одержаними трансформантами визначали на 72-96 год. вирощування. Всі проаналізовані штами характеризувались підвищеним синтезом РФ в лактозо вмісних середовищах (YNB із лактозою та молочній сироватці) порівнянно з батьківськими штамами. Продуктивність синтезу РФ штамами AF-4, що містили плазмиду pNTC/prLAC4-SEF1 (трансформанти одержали назву: AF-4/prLAC4-SEF1) за вирощування у середовищі з лактозою була в 2 рази вищою, ніж у реципієнтного штаму AF-4 (Рис. 3.25).

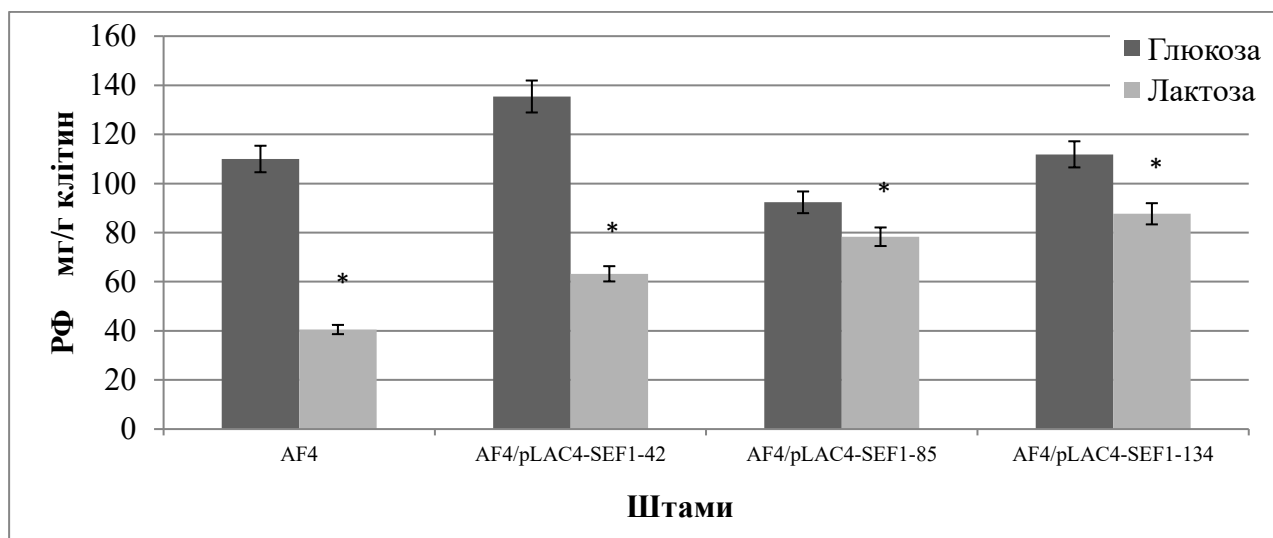


Рис. 3.25. Продуктивність синтезу РФ реципієнтним штамом AF-4 та рекомбінантними штамами AF-4/prLAC4-SEF1 *Candida famata* (42, 85, 134), що експресують додаткову копію гена SEF1 *Candida famata* під контролем лактозо-індуцибельного промотора LAC4 *Candida famata*. Вирощування проводили в середовищі YNB із додаванням 0,2% дріжджового екстракту та 2 % глюкози або 2 % лактози упродовж 72 год. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

У цій частині роботи ми показали, що надекспресія додаткової копії власного гена *SEF1 C. famata* під контролем лактозо індуцибельного промотора гена *LAC4 C. famata* у раніше сконструйованому надсинтетику РФ AF-4 привела до підвищення продукції РФ на мінеральному середовищі YNB + 0,2% дріжджового екстракту із лактозою в порівнянні із батьківськими

реципієнтними штамми на цьому ж лактозовмісному середовищі. Хоча, використання глюкози, забезпечує, все ще вищу продуктивність РФ всіх досліджуваних штамів.

Для з'ясування залежності продукції РФ від тривалості вирощування було проведено інкубацію вирощених у середовищі YPD клітин трансформантів у середовищі YPL, що містило як джерело Карбону лактозу. Отримані рекомбінантні штами синтезували значно більше РФ, ніж батьківський штам AF-4. Найвища продукція РФ рекомбінантними штамми AF-4/prLAC4-SEF1 у середовищі YPL із 2% лактозою сягала максимуму на 3-добу, після чого, продукція РФ не збільшувалась (Рис. 3.26).

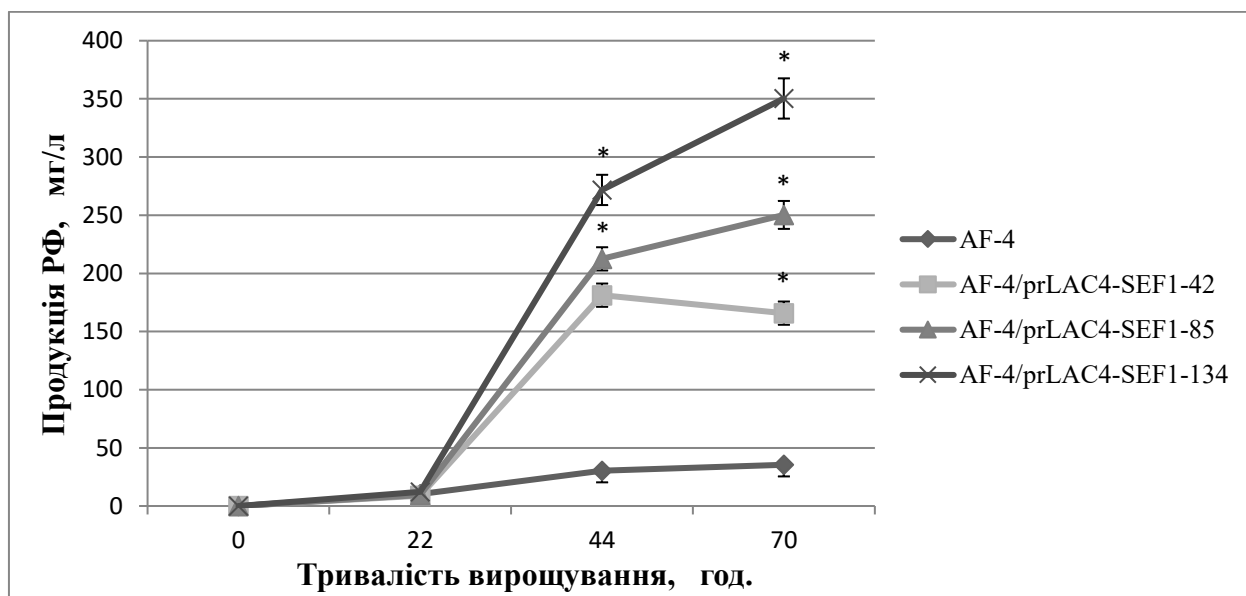


Рис. 3.26. Продукція РФ реципієнтним штамом AF-4 і рекомбінантними штамми AF-4/prLAC4-SEF1 (42, 85, 134) *Candida famata*, що експресують додаткову копію гена *SEF1* під контролем промотора гена *LAC4* *Candida famata*.

Клітини культивували в середовищі YPD упродовж 24 год та переносили у лактозовмісне багате середовище YPL із 2% лактозою (100 мг клітин/л). Тривалість вирощування становила 70 год. Досліджували здатність одержаних

трансформантів синтезувати РФ за умов використання як культурального середовища МС із додаванням амонію сульфату. Вирощування проводили упродовж 90 год (Рис. 3.27).

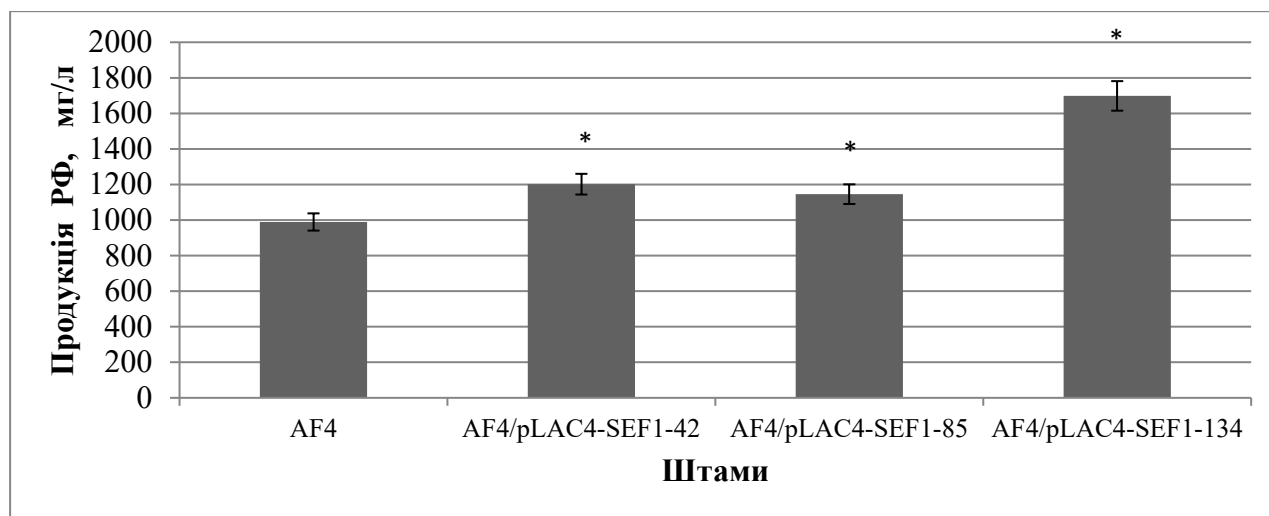
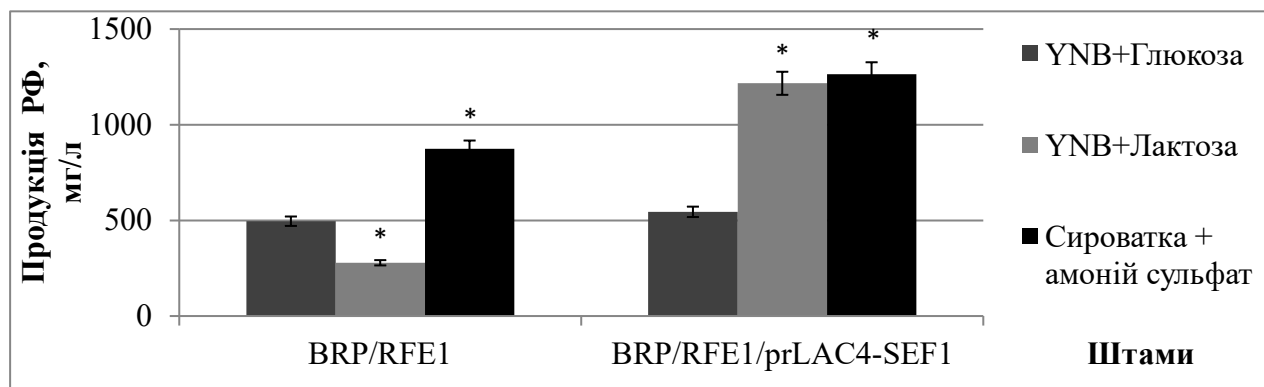


Рис. 3.27. Продукція РФ реципієнтним штамом AF-4 та рекомбінантними штамми AF-4/prLAC4-SEF1 (42, 85, 134) *Candida famata*, що експресують додаткову копію гена *SEF1* *Candida famata* під контролем лактозо-індуцибельного промотора гена *LAC4* *Candida famata*. Вирощування проводили у молочній сироватці з амоній сульфатом (3 г/л) упродовж 90 годин. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

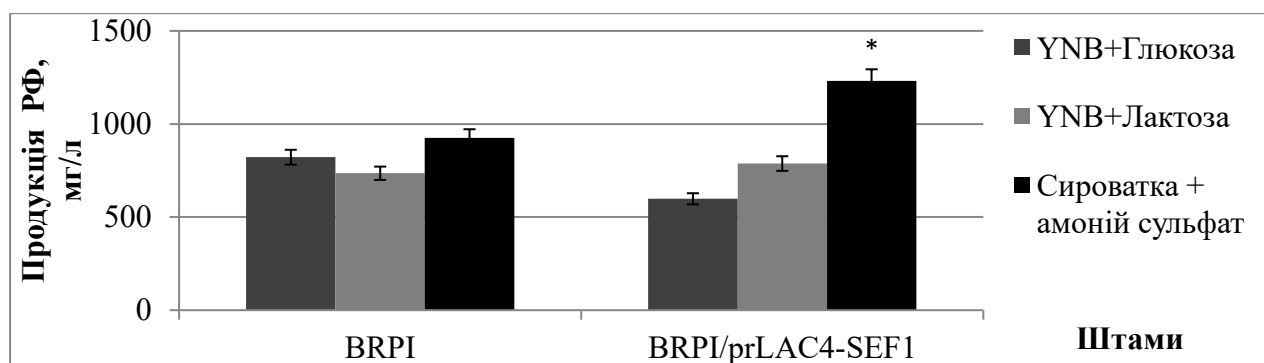
За цих умов спостерігали зростання рівня синтезу РФ рекомбінантами порівняно з реципієнтним штамом. Продукція РФ у штаму 134 становила близько 1600 мг/л РФ, що було на 30 % вище продукції цього вітаміну реципієнтним штамом AF-4.

Ключовим етапом цього дослідження, було визначення здатності до найвищої продукції РФ за умов вирощування в сироватці серед найкращих сконструйованих рекомбінантних штамів *C. famata*. Для цього як реципієнтні штамми було використано сконструйовані нами штамми із введеним геном РФ-екскретази (BRP/RFE1) (див. розділ 3.1) та рекомбінантний штам з покращеним постачанням пуринів *de novo* (BRPI) (Dmytruk et al., 2020).

Досліджено здатність до надсинтезу РФ сконструйованими штамми, вирощеними у середовищах різного складу. Як і очікувалось, введення плазмиди pNTC/prLAC4-SEF1 забезпечило значне підвищення продукції РФ отриманими штамми у середовищах із лактозою (Рис. 3.28).



А



Б

Рис. 3.28. Продукція рибофлавіну реципієнтними штамми BRP/RFE1 (А) та BRPI (Б) *Candida famata*, а також одержаними на їх основі рекомбінантами BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 (А) і BRPI/prLAC4-SEF1 (Б). Вирощування проводили в середовищі YNB із додаванням 0,2% екстракту дріжджів з різними джерелами 2% Карбону (1-глюкоза, 2-лактоза) та сироватці упродовж 90 годин. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Одержані дані засвідчили зростання рівня продукції РФ на третину в рекомбінантів BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 та BRPI/prLAC4-SEF1 порівняно із

реципієнтними штамами BRP/RFE1 і BRPI (відповідно). Важливим є також те, що вихід РФ у рекомбінантних штаммах *C. famata* із інтегрованою в геном плазмідною рNTC/prLAC4-SEF1 в сироватці вищий, ніж у стандартному поживному середовищі YNB із глюкозою. Очікувано сироватка більш суттєво стимулює синтез РФ сконструйованими штамми в порівнянні з середовищем YNB із лактозою. Оскільки сироватка є натуральним лактозо вмісним продуктом, широкий спектр різних компонентів може додатково стимулювати промоторну активність гена *LAC4* та флавіногенез в цілому. Це робить використання сироватки для вирощування дріжджів - надсинтетиків РФ - одним із перспективних шляхів зниження собівартості виробництва РФ та більш раціонального використання побічних продуктів молочної промисловості.

3.3. Конструювання рекомбінантного штаму дріжджів *Candida famata* із здатністю до синтезу антибіотичної сполуки амінорибофлавіну

До групи флавінів відносять не лише сполуки із пробіотичною дією, такі як РФ та його похідні ФМН і ФАД. Грунтові бактерії *Streptomyces davaonensis* та *Streptomyces cinnabarinus* здатні синтезувати флавіни - розеофлавін (РоФ) та його метаболічний попередник амінорибофлавін АФ (Otani et al., 1974; Matsui et al., 1979; Otani et al., 1980). Вони виявляють виражену антибіотичну дію проти ряду патогенів, серед яких *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Plasmodium falciparum* та ін (Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017; Jankowitsch et al., 2011; Hemasa et al., 2022). РоФ також виявляє цитотоксичну дію на клітини ссавців, тоді як АФ діє головно на мікроорганізми, що робить його перспективним лікарським засобом. На даний час обидві сполуки одержують лише складним та вартісним хімічним синтезом у невеликих кількостях. Тому створення мікробних надсинтетиків, в першу чергу АФ, є перспективним напрямком сучасної біотехнології у сфері медицини. Оскільки в клітинах бактерій АФ

синтезується із ФМН, ми спробували змодельовати цей процес у дріжджах надсинтетиках ФМН, які були сконструйовані у нашому відділі МГіБ - штам *FP C. famata* (Yatsyshyn et al. 2009).

Створення дріжджового продуцента АФ проводили конструюванням плазміди із адаптованим до дріжджової кодонової системи геном *rosB S. davaonensis* та її подальшим введення у геном надсинтетика ФМН *C. famata FP*. Цей штам характеризується підвищеним рівнем продукції ФМН, завдяки введеному гену *FMN1_D.h* дріжджів *D. hansenii* (кодує фермент РФ-кіназу) під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1 C. famata*, що кодує фактор елонгації трансляції.

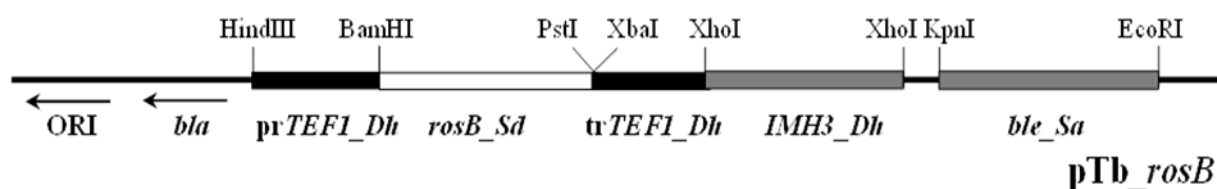
3.3.1. Конструювання плазміди, що містить ген біосинтезу амінорибофлавіну - *rosB* бактерій *Streptomyces davaonensis* та одержання на її основі дріжджових рекомбінантних штамів *Candida famata*

Оскільки дріжджі роду *C. famata* використовують нетрадиційну дріжджову кодонову систему, в якій кодон CUG кодує серин, а не лейцин (Voronovsky et al., 2004; Dmytruk and Sidirny, 2012), як у інших мікроорганізмів, ген *rosB* був замовлений та штучно синтезований фірмою BioCat GmbH (Хейделберг, Німеччина) з урахуванням цієї ознаки. Модифікований ген *rosB S. davaonensis* вводили у плазмиду pTb під контролем конститутивного промотора та термінатора гена *TEF1 D. hansenii*. Конструювання плазміди, що містить експресійну касету *TEF1-rosB*, проводили у декілька етапів. Промотор і термінатор гена *TEF1* ампліфікували з геномної ДНК *D. hansenii* CBS767 відповідними парами праймерів: Ko427 (AAA AAG CTT GCT CCC CCC TAC CAA GCC TAC) / Ko428 (GAC TTT CCC AAA TAC GTT TAA GGA GCC TGCG TGC AG ACG CGG CCG CGG ATC CTT TGA TTA ATT AAT ATA TAA AAT ATA TGT TTG TGG) і Ko429 (CCA CAA ACA TAT ATT TTA TAT ATT AAT TAA TCA AAG GAT CCG CGG CCG CGT CGA CCT GCA GGC TCC TTA

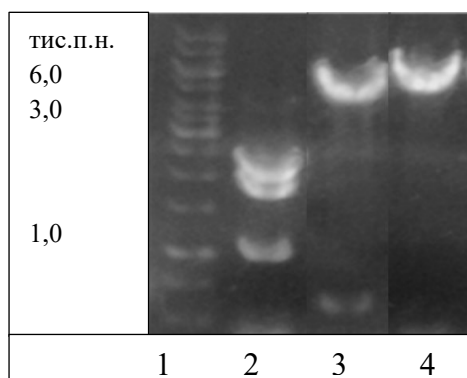
GACG ACA GGC TCC TTA GACG) / K_o430 (AAA TCT AGA GAT TAT TGA CTC GAG ATG TTG CGC CG).

Ампліфікований із геному фрагмент промотора *TEF1* розміром 973 п. н. обробляли ендонуклеазами *HindIII/XbaI* і клонували в *HindIII/XbaI* - розщеплену плазмиду pTb (Dmytruk et al., 2011, Andeieva et al., 2020). Далі, адаптований ген *rosB* клонували у ділянку між промотором і термінатором *TEF1* у плазміді pTb за сайтами ендонуклеаз *BamHI/PstI*.

Додатково, у плазмиду ввели ген резистентності до мікофенольної кислоти (МФК) *IMH3 D. hansenii* (Yatsyshyn et al. 2009). Цей ген був попередньо ампліфікований із дріжджів *D. hansenii*, використовуючи праймери: IMH3-fr (AAT TCT CGA GGT CGA TGG TCT TGA TCA TTC) / IMH3-rev (TAA TCT CGA GGC ATT CTG TTC CAG TTT CTG). Фрагмент клонували у сайт рестрикції *XhoI*, що також містився і в плазміді. Сконструйовану плазмиду (одержала назву pTb_rosB) аналізували методом ендонуклеазної рестрикції із наступним електрофоретичним розділенням у гелі агарози (Рис. 3.29).



А



Б

Рис. 3.29. Схема сконструйованої плазмиди pTb_rosB, що містить модифікований ген *rosB* *Streptomyces davaonensis* під контролем конститутивного промотора *TEF1* (А) та аналіз плазмиди pTb_rosB шляхом ендонуклеазної рестрикції (Б) (розмір плазмиди 5666 п. н.).

Для конструювання плазмиди використали сайт реплікації ORI та ген стійкості до ампіциліну (*bla*); промотор і термінатор гена *TEF1* *D. hansenii*; оптимізовану за кодоном версію гена *rosB* *S. davaonensis*. Також у плазмиду ввели гени резистентності *IMH3* *D. hansenii* та *ble* *S. aureus* для відбору трансформантів, стійких до МФК та флеоміцину (відповідно). Отримані дані засвідчили правильність проведеного конструювання та відповідність розмірів усіх фрагментів ДНК. Електрофореграма рестрикційного аналізу плазмиди pTb_RosB дозволила виявити очікувані фрагменти ДНК: гідроліз рестриктазою BglII (фрагменти розміром (п. н): 1118, 2004, 2544), 3 - гідроліз рестриктазою KpnI (фрагменти розміром (п. н): 664, 5002), 4 - гідроліз рестриктазою HindIII (лінеаризація плазмиди, розмір 5666 п. н) (Рис 3.29).

Після цього лінеаризовану плазмиду, що містила модифікований ген *rosB* вводили у продуцент ФМН *C. famata* FP методом електропорації. Трансформовані клітини висівали на агаризоване середовище з антибіотиком МФК в концентрації 20 мкг/мл для проведення відбору колоній. Частота появи трансформантів становила близько 50 колоній на 1 мкг плазмідної ДНК. Рекомбінанти стабілізували почерговими пересівами із середовищ без, та з селективним антибіотиком МФК. Наявність введеної плазмиди у геномі трансформованих клітин було підтверджено ПЛР із праймерами RBFa (TAT TGA ACA CAA CCT TGC GTC G) / RBRa (ATC CTA ACT GAG ATT CCT CAA CC) (Рис. 3.30). Були отримані фрагменти передбачуваного розміру (~0,75 т.п.н.). Сконструйовані рекомбінантні штами одержали назву - FP/rosB.

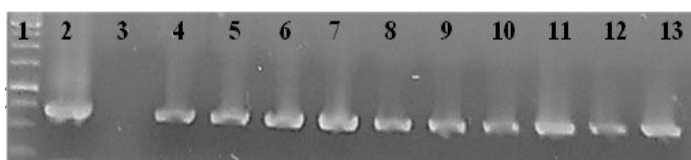


Рис. 3.30. ПЛР аналіз одержаних трансформантів FP/rosB *Candida famata*. 1 – маркер молекулярної маси фрагментів ДНК; рядок 2 – позитивний контроль (плазмиди рTb_rosB); 3 – негативний контроль (хромосомна ДНК реципієнтного штаму FP *Candida famata*; Рядки 4-14 – рекомбінантні штами FP/rosB.

Проведені аналізи підтвердили успішне конструювання плазмиди та отримання рекомбінантних штамів. Для аналізу продукції флавінів трансформантами FP/rosB *C. famata*, дріжджі вирощували у модифікованому середовищі Беркгольдера упродовж 44 год. за температури 30°C із початковою внесеною біомасою 0,15 г/л. Одержану культуральну рідину використали для подальших аналізів.

3.3.2. Аналіз різних форм флавінів культуральної рідини *Streptomyces davaonensis* та рекомбінантних штамів FP/rosB *Candida famata*

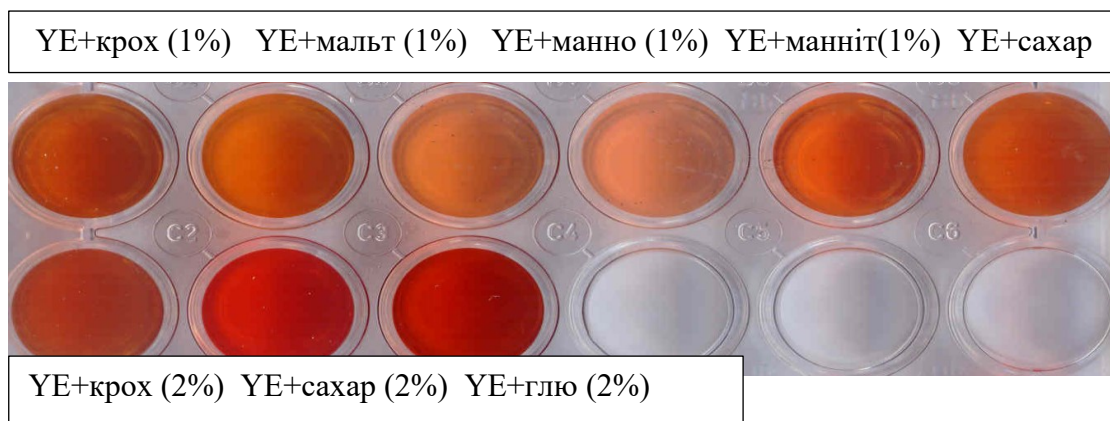
На першому етапі було використано хроматографічне розділення фракцій флавінів культурального середовища в розчині 5% Na_2HPO_4 . Оскільки, очікувалось проведення, в першу чергу, візуального аналізу на наявність АФ у культуральних середовищах дріжджів, необхідно було використати як позитивний контроль культуральне середовище природного продуцента РоФ та АФ – бактерій *S. davaonensis* (Matsui et al., 1979).

Зазвичай у лабораторних умовах, для вирощування цього виду бактерій використовують вівсяний відвар. Оскільки було заплановано використання культуральної рідини для визначення якісного та кількісного вмісту флавінів, необхідно було оцінити запропоновані поживні середовища для вирощування стрептоміцетів (Matsui et al., 1979; Kieser et al., 2000, Федоренко та ін., 2007), використання яких забезпечило отримання флавіновмісної культуральної рідини, вільної від клейких субстанцій вівсяного відвару.

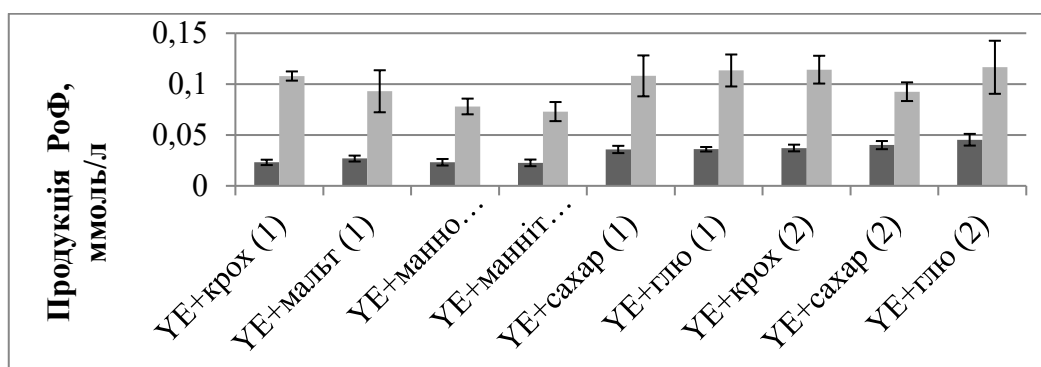
Для цього був проведений аналіз здатності бактерій *S. davaonensis* до росту та продукції РоФ у середовищах різного складу із різними джерелами Карбону, що опубліковані для цього виду бактерій (див розділ 2.5).

Вирощування бактерій у згаданих вище середовищах проводилось упродовж 7 днів за температури 37 °C. Одержані культуральні рідини аналізували візуально оскільки РоФ характеризується яскравим червоним забарвленням. Також проводили кількісні вимірювання вмісту РоФ та біомаси клітин *S. davaonensis* за вирощування в різних середовищах (Рис. 3.31).

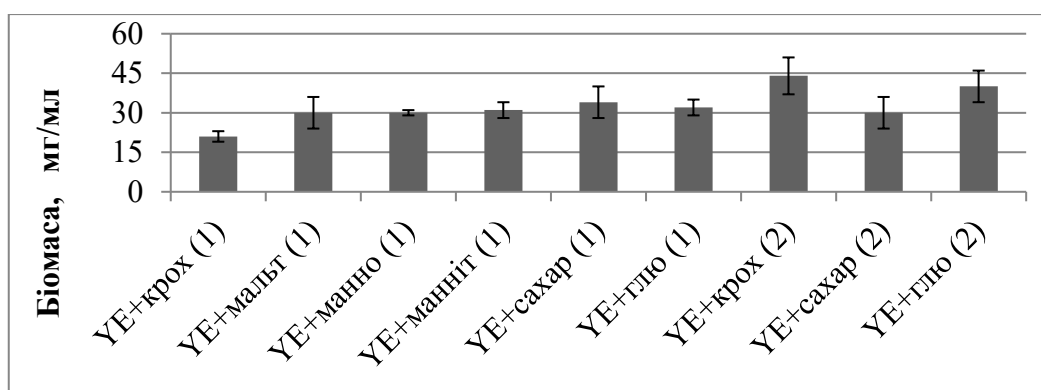
Вміст РоФ та кількість нагромадженої біомаси визначали методом спектрофотометрії і флюориметрії.



А



Б



В

Рис. 3.31. Продукція розеофлавіну та біомаса *Streptomyces davaonensis* у рідких поживних середовищах (7 днів вирощування, 37 С, 1% та 2% карбонових субстратів; YE - дріжджовий екстракт): А) культуральне середовище після видалення клітин, Б) концентрації РоФ у культуральному середовищі (ммоль/л) (стовпці №1), вихід РоФ (ммоль/г клітин) (стовпці №2) відповідно. В) біомаса (г/л).

Наші дані показали, що продукція РоФ в середовищах із 1% Карбону: YE+крохмаль, YE+мальтоза, YE+манноза та YE+маннітол знаходиться на рівні, опублікованому (Schwarz et al., 2016) - 0,021 мкмоль/мл. Крім того, 1% YE+сахароза, YE+глюкоза та збільшення концентрації карбонових субстратів до 2% у середовищах YE+крохмаль, YE+сахароза, YE+глюкоза дозволяють одержати майже вдвічі більшу кількість РоФ.

Додаткове використання дріжджового екстракту, багатого вітамінами групи В та збільшення концентрації Карбону (глюкози) до 2% - забезпечили максимальний синтез РоФ диким штамом *S. davaonensis*.

Культуральну рідину одержану при вирощуванні бактерій *S. davaonensis*, а також реципієнтного штаму FP *C. famata* і його похідного, що містить плазмиду без гена *rosB* - FP/*rosB*, використовували як позитивний та 2 негативні контролю, відповідно. Сумарну кількість флавінів у середовищі вимірювали методом спектрофотометрії.

Для більш детального аналізу досліджувані зразки культуральної рідини об'ємом 150 мкл наносили на хроматографічний папір і розділяли в розчині 5% Na₂HPO₄. Відокремлені фракції флавінів аналізували візуально за значеннями коефіцієнтів утримання (retardation factor (*R_f*)) (György and Pearson, 1967; Juri et al., 1987; Tyagi et al., 2009) та проводили кількісну оцінку методом спектрофотометрії елюйованих фракцій флавінів із хроматограм (Рис. 3.32; Табл. 3.6).

Хроматографію проводили упродовж 3-5 год. для повного розділення флавінових фракцій в аналізованих культуральних рідинах. Отримані фракції аналізували.

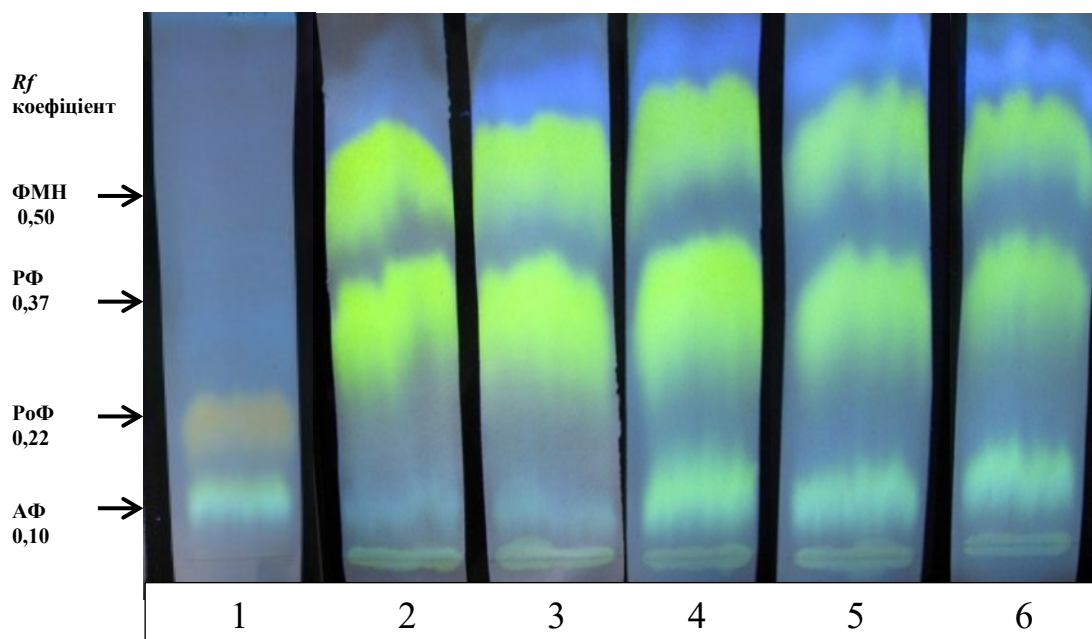


Рис. 3.32. Хроматографічне розділення флавінових фракцій культуральних середовищ: 1 – позитивний контроль *Streptomyces davaonensis*; 2-3 – негативні контролі (FP *Candida famata* та FP *C. famata*, що містить плазмиду без гена *rosB*); 4-6 - трансформанти FP/*rosB* *C. famata* із введеною плазмідною рTb_*rosB* (1/3; 1/4; 1/5).

Таблиця 3.6.

Спектрофотометричний аналіз загальних флавінів та хроматографічно-розділених флавінових фракцій

	<i>C.famata</i> FP (контроль)	<i>C.famata</i> FP/ <i>rosB</i> pTb-IMH3 (контроль)	<i>C.famata</i> FP/ <i>rosB</i> (№ 1/3)	<i>C.famata</i> FP/ <i>rosB</i> (№ 1/4)	<i>C.famata</i> FP/ <i>rosB</i> (№ 1/5)
Загальні флавіни (мг/л)	104.20±3.05	89.23±2.78	93.74±1.98	44.83±0.77	38.75±0.87
ФМН	42.50±1.12	20.54±0.45	16.55±0.75	10.44±0.34	9.37±0.11
РФ	21.03±0.54	18.24±0.32	20.78±0.89	8.42±0.21	6.25±0.12
АФ	-	-	5.21±0.09	4.56±0.12	4.36±0.09
Біомаса (г/л)	8.00±0.19	7.64±0.08	7.03±0.07	6.91±0.23	6.92±0.19
Продуктивність синтезу АФ (мг/г клітин)	-	-	0.74±0.02	0.58±0.01	0.62±0.02

Проведений хроматографічний аналіз дозволив виявити нову флавінову фракцію в більшості протестованих трансформантів, що містять плазмиду pTb_rosB. Дана фракція розташовувалась на хроматографічному папері відповідно до значення коефіцієнта утримання R_f , опублікованого для АФ (0,10) та співпадала із фракцією АФ із культурального середовища *S. dawaonensis*.

Для ґрунтового аналізу нової фракції використали мас-спектрометрію. Даний аналіз був проведений у Жешівському університеті (Польща) в межах договору про співпрацю. Встановлено, що виявлена фракція в культуральному середовищі сконструйованих дріжджових трансформантів FP/rosB *C. famata* є АФ. Методом кількісного аналізу із використанням опублікованого для амінірибофлавіну коефіцієнту молекулярної екстинції (Chapman and Reid., 1999; Tyagi et al., 2009) встановлено, що культивування трансформантів *C. famata* упродовж 44 год дозволяє накопичити у культуральній рідині до 5,2 мг/л АФ. Завдяки проведеній роботі, вперше вдалось отримати рекомбінантні штами дріжджів, що набули здатності до синтезу бактерійної антибіотичної сполуки - АФ. Покращення трансформантів з метою підвищення продуктивності АФ є перспективним напрямком подальших досліджень в медичному, біотехнологічному та мікробіологічному напрямках.

3.4. Підсумок

У представленій дисертаційній роботі розроблено та використано різні підходи генної інженерії для конструювання дріжджових надсинтетиків флавінів.

На першому етапі проведено конструювання штамів дріжджів *C. famata* які надекспресують ген РФ-екскретази *REF1* під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1*. Надекспресія згаданого гена привела до підвищення рівня синтезу РФ у 1,5 раза. Вперше виявлено збільшення рівня

продукції РФ, активації ферменту першого етапу біосинтезу цього вітаміну ГТФ-циклогідролази II та експресії гена *RIB1* (кодує цей фермент) у 2 рази.

На другому етапі роботи створено рекомбінантні штами *C. famata*, які надекспресують ген транскрипційного фактора *Sef1* позитивного типу дії під контролем лактозо-індуцибельного промотора *LAC4*. Цей підхід забезпечив підвищення рівня продукції РФ за умови культивування у лактозовмісних середовищах, зокрема, у молочній сироватці. Використання як культурального середовища дешевого побічного продукту молочної промисловості – молочної сироватки дозволило виявити активний ріст та флавіногенез рекомбінантних штамів *C. famata* за умови внесення додаткових мінеральних джерел Нітрогену – амоній сульфату, сечовини або діамоній гідрофосфату. Беручи до уваги низьку вартість молочної сироватки та нітрогенвмісних мінеральних солей, запропонований технологічний підхід дозволить суттєво знизити вартість мікробного виробництва РФ та забезпечити утилізацію відходів харчової промисловості для захисту довкілля.

На заключному етапі дисертаційної роботи проведено гетерологічну експресію ключового гена біосинтезу амінорибофлавіну *rosB* бактерій *S. davaonensis* у дріжджовому надсинтетику ФМН FP *C. famata*. Ген отримали синтетичним шляхом із необхідними модифікаціями кодонової системи. Оскільки амінорибофлавін синтезується в клітинах бактерій із ФМН, надекспресія гена *rosB* у згаданому штамі дріжджів привела до синтезу цієї бактерійної антибіотичної сполуки у дріжджах. Це перша вдала спроба отримання еукаріотичних дріжджових продуцентів антибіотичної сполуки прокаріотичних мікроорганізмів - бактерій роду *Streptomyces*.

Подальші дослідження процесів регуляції синтезу корисних флавінових сполук та конструювання рекомбінантних штамів, здатних до надпродукції рибофлавіну та амінорибофлавіну дозволять підвищити ефективність мікробного синтезу та у перспективі налагодити їх рентабельне промислове виробництво.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Конструювання мікроорганізмів із підвищеною продукцією РФ є перспективним напрямком сучасної біотехнології та мікробіології. Промислове виробництво цього вітаміну здійснюється шляхом мікробного синтезу, що сприяє зниженню собівартості продукції, захисту довкілля та одержанню кінцевого продукту високого ступеня чистоти. Також заощаджується електроенергія та не використовуються шкідливі сполуки хімічного синтезу. Кожен вид надсинтетика РФ – бактерії, міцеліальні гриби та дріжджі мають свої недоліки та переваги (Stahmann et al., 2000; Averianova et al., 2020). Світовий ринок виробництва РФ на 2021 рік складав 400 млн. доларів обсягом 12 тис. тонн на рік (*Riboflavin Market – Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022-2027)*, 2022). Декілька великих іноземних компаній (BASF, DSM та Hubei Guangji Pharmaceutical) активно використовують у виробництві генетично модифіковані штами бактерій *Bacillus subtilis* і міцеліальний гриб *Ashbya gossypii*. Раніше американською фірмою ADM було налагоджено виробництво РФ штамами дріжджів *der8 C. famata*, одержаних методом класичного мутагенезу. Проте внаслідок низької генетичної стабільності цього штаму таке виробництво припинене.

Дослідження з використанням методів класичного мутагенезу, дозволили отримати стабільний штам AF-4, проте рівень синтезу РФ цим штамом був недостатнім. Завдяки швидкому розвитку генної інженерії та впровадженню її методів для створення рекомбінантних мікроорганізмів, на основі штаму AF-4 було сконструйовано нові стабільні надсинтетики РФ – BRP та BRPI, шляхом введення структурних генів флавінеогенезу *RIB1*, *RIB7*, регуляторного гена *SEF1* та генів пуринового синтезу *PRS3m/ADE4m* (Dmytruk et al., 2011 Dmytruk et al., 2020). Проте і цей штам, все ще потребує покращення рівня виходу РФ для налагодження рентабельного мікробного синтезу в промислових масштабах. Подальше покращення дріжджових штамів-надсинтетиків РФ

вимагає дослідження механізмів регуляції біосинтезу цього вітаміну та застосування генно-інженерних підходів для їх конструювання.

Метою наших досліджень було з'ясування можливості підвищення флавіногенної активності дріжджів *C. famata* за рахунок посилення екскреції РФ шляхом введення в активний надсинтетик РФ - штам BRP, гена РФ-екскретази (*RFE1*), що забезпечує транспорт РФ із дріжджової клітини у культуральне середовище. Активніше вивільнення РФ із клітин може призвести до збільшення накопичення цього вітаміну в середовищі. Раніше було встановлено, що посилена експресія гена *SEF1*, який є позитивним регулятором біосинтезу РФ у дріжджів, призводить не тільки до зростання продукції РФ, а й до підвищення стабільності штамів *C. famata* -надсинтетиків РФ (Dmytruk et al., 2011). Беручи до уваги здатність дріжджів *C. famata* рости та синтезувати флавіни у середовищах, що містили як джерело Карбону лактозу, було заплановано надекспресувати ген *SEF1* під контролем лактозо індукцибельного промотора *LAC4* гена β -галактозидази. Очікувалось, що використання саме цього промотора дозволить отримати штами, здатні до підвищеного синтезу РФ на дешевому побічному продукті молочної промисловості – молочній сироватці (МС). Використання МС дозволить суттєво скоротити витрати на мікробний синтез РФ у процесі виробництва, а також забезпечити утилізацію залишкових кількостей МС, що додатково сприятиме збереженню довкілля.

Ще одним із завдань цієї роботи було конструювання принципово нових дріжджових продуцентів бактерійної флавінової сполуки - амінорибофлавіну (АФ), який здатні синтезувати лише бактерії *Streptomyces davaonensis* та *Streptomyces cinnabarinus*. АФ виявляє антибіотичну дію щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій (Otani et al., 1974; Kasai et al., 1978; Matsui et al., 1979). До них відносять *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* а також *Plasmodium falciparum* (Matsui et al., 1979; Jankowitsch et al., 2011; Hemasa et al.,

2022). Встановлено, що АФ є метаболічним попередником біосинтезу антибіотика розеофлавіну (РоФ) у бактерій *S. davaonensis* та *S. cinnabarinus* (Schwarz et al., 2016). Серед патогенів - мішеней, в першу чергу, слід згадати золотистий стафілокок (*S. aureus*) та його метицилін-резистентні штами MRSA (Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017), що спричиняють небезпечні та широко поширені інфекції у випадку хірургічних втручань і здатні швидко набувати резистентності до класичних антибіотиків. Це, у свою чергу, значно підвищує кількість летальних випадків серед інфікованих пацієнтів. Беручи до уваги проведення бойових дій в Україні, наявність поранених, головним чином із відкритими пошкодженнями поверхонь тіла та відсутності стерильних умов для проведення першої медичної допомоги, дана проблема є надзвичайно актуальною. РоФ, на відміну від АФ виявляє цитотоксичну дію не лише на патогенні бактерії але і на клітини ссавців. Тому його використання в широкій медичній практиці без відповідних модифікацій є малоімовірним. На відміну від РоФ, АФ проявляє цитотоксичну дію лише на бактерії, через нездатність клітин ссавців до його перетворення в клітині у біологічно активну форму цитотоксичного аналогу флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) - АФАД (Pedrolli et al., 2011; Pedrolli et al., 2013). Шлях біосинтезу РоФ та АФ у природних продуцентів *S. davaonensis* був відкритий відносно недавно (Schwarz et al., 2016; Schneider et al., 2020). Це забезпечило передумови для розробки стратегії генного втручання у даний процес.

На першому етапі роботи, нами був проведений пошук дріжджового аналога гена РФ-екскретази людини (*BCRP1*, Breast Cancer Resistant Protein; Herwaarden et al., 2007; Merino et al., 2010; Mao et al., 2015) у декількох видів дріжджів. Оскільки геном дріжджів *C. famata* секвенований не повністю, як матрицю використали геном близького до дріжджів *C. famata* теж флавіногенного виду *Debaryomyces hansenii*. Виявлений аналог гена (отримав назву *RFE1*, RiboFlavin Excretase 1) був ампліфікований та введений у штам надсинтетик РФ BRP *C. famata* під контролем сильного конститутивного

промотора *TEF1* *C. famata*. Більш детальний аналіз рівня експресії введеної плазмиди у геномі трансформантів проводили сучасним методом ПЛР у реальному часі (RT-PCR). Було встановлено 3-х кратне збільшення рівня експресії гена *RFE1* в порівнянні із диким типом *D. hansenii* та, як і очікувалось, відсутність експресії даного гена у реципієнтного штаму *C. famata*.

Аналіз флавіногенної активності одержаних рекомбінантних штамів (отримали назву BRP/RFE1) у багатому живильному середовищі YPD засвідчив суттєве збільшення продуктивності синтезу РФ у 1,5 раза в порівнянні з реципієнтними штамами. Кінетичний аналіз продукції кращого із трансформантів BRP/RFE1 47 показав найвищий рівень продукції РФ на 96 - 120 години вирощування. Хроматографічний аналіз флавінів культуральної рідини отриманих рекомбінантних штамів з надекспресованим геном *RFE1* засвідчив наявність високого ступеня чистоти РФ у культуральному середовищі рекомбінантів. Наступні аналізи дозволили виявити зменшення кількості внутрішньоклітинного РФ у 1,5 раза в дріжджових клітинах рекомбінантів BRP/RFE1, що було очікуваним, беручи до уваги транспортну роль білкового продукту введеного гена РФ- екскретази. Цікаві дані було отримано при аналізі ферментативної активності ГТФ – циклогідролази II ферменту першого етапу біосинтезу РФ, що кодується геном *RIB1*. Було встановлено 2 -х кратне збільшення активності даного ферменту, що позитивно корелювало із зменшенням кількості внутрішньоклітинних флавінів у 1,5 раза. Проведений аналіз рівня експресії гена *RIB1* виявив його 2-х кратне збільшення.

Зростання виходу цільового продукту можна отримати не тільки конструюванням нових штамів, а й оптимізацією умов вирощування. Як вже згадувалось вище, дріжджі насинтетики РФ *C. famata* здатні рости та продукувати флавіни у середовищах, що містять лактозу як джерело Карбону, зокрема можуть добре рости і синтезувати РФ на молочній сироватці.

Проведені дослідження показали, що продукція РФ залежить від концентрації лактози у молочній сироватці та від джерела Нітрогену.

Оптимальною концентрацією лактози для забезпечення росту і синтезу РФ в сироватці є 2,5 - 5 %. Обов'язковим є додавання до МС додаткового джерела Нітрогену (амоній сульфату, діамоній гідрофосфату, сечовини). Ріст на більш концентрованій сироватці (від 7% лактози і вище) суттєво пригнічувався, та повністю зупинявся при концентрації лактози 12%, хоча гальмування росту не викликалося лактозою.

Наступним етапом роботи була спроба методом класичного УФ - мутагенезу одержати мутанти на основі штаму BRP, здатні до росту на концентрованій МС. Шляхом селекції було відібрано штами дріжджів, що виявили задовільний ріст та флавіногенез на агаризованих середовищах концентрованої МС (12% лактози). Вирощування у рідкій 12% МС дозволило отримати 10 кратне збільшення біомаси отриманих мутантів та 3- х кратне збільшення продукції РФ порівняно із реципієнтним штамом BRP (20 і 2 мг клітин/мл та 500 і 130 мг РФ/мл, відповідно). Використання вищих концентрацій сироватки (15% лактози і вище) повністю інгібувало ріст отриманих мутантів.

Використання саме концентрованої МС як поживного середовища є важливою передумовою для зменшення собівартості мікробного виробництва РФ. Це забезпечить зменшення ваги та об'ємів субстрату для транспортування із підприємств молочної галуззі на виробничі потужності мікробного синтезу РФ. Беручи до уваги можливе зменшення ваги та об'єму транспортувальної сировини у 2-3 рази фінансова вигода даного впровадження може суттєво покращити прибутковість виробництва РФ.

Для первинних аналізів як додаткового джерела Нітрогену було використано амоній сульфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, оскільки ріст та синтез РФ дріжджами у чистій МС був слабкий. Для пошуку оптимального джерела Нітрогену, ми також використали: сечовину $(\text{CH}_4\text{N}_2\text{O})$, комбінацію сечовини і амоній сульфату $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, діамоній гідрофосфат $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ та амоній дигідрофосфат $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ у концентрації 3 г/л. Результати засвідчили

активний ріст та флавіногенез у всіх використаних комбінаціях нітроген вмісних сполук у МС. Проте найбільше накопичення біомаси спостерігалось при додаванні сечовини, діамоній гідрофосфату та амоній дигідрофосфату. Кількість отриманої біомаси була схожа при використанні МС та культурального середовища YNB+YE, причому рівень продукції РФ у МС при додаванні зазначених джерел Нітрогену був навіть дещо вищий, що є важливим беручи до уваги дешевизну МС у порівнянні із середовищем YNB+YE.

Для пошуку альтернативних дешевих джерел Карбону, було використано середовище YNB+YE із додаванням 2% чистого гліцеролу. Спостерігався схожий до глюкозовмісного середовища рівень накопичення біомаси, проте синтез РФ був нижчий у 3 рази. Також спробували використати не очищений технічний гліцерол, що отримують як шкідливий для довкілля залишок хімічної промисловості. Технічний гліцерол - це побічний продукт виробництва біодизелю (Da Silva et al., 2009, Semkiv et al., 2020). Такий гліцерол містить у своєму складі, крім гліцеролу, солі натрію або калію, метанол (до 15%), ліпіди та інші компоненти. У середовищі із неочищеним гліцеролом ріст та флавіногенез у дріжджів не спостерігався навіть при додаванні глауконіту, який використовується як детоксикуючий агент (Smith et al., 1996). За допомогою методів класичного мутагенезу було отримано мутанти, здатні до покращеного синтезу РФ у середовищі, де чистий гліцерол був єдиним джерелом Карбону. Проте мутантів, здатних до росту на не очищеному гліцеролі отримати не вдалось.

Наступним етапом, була розробка лабораторного регламенту вирощування для дріжджових надсинтетиків РФ BRP/RFE1. Ми перевірили запропоновану раніше схему двоступінчатого вирощування дріжджів. Клітини дріжджів вирощували в оптимізованому для *S. *famata** середовищі з вмістом глюкози 20 г/л. Характерною рисою даної схеми вирощування є використання на другому етапі середовища з високим вмістом глюкози (70 г/л) та внесенням великої кількості клітин у середовище, що забезпечило швидкий ріст дріжджових

клітин та нагромадження максимальної кількості РФ вже через 48 годин вирощування. Виявлено підвищену продукцію РФ штамом BRP/RFE1 порівняно із реципієнтним штамом BRP в 1,5 раза (1300 мг/л та 900 мг/л відповідно). Крім цього було встановлена чітка позитивна кореляція між внесеною кількістю клітин та отриманими біомасою і кількістю синтезованого РФ.

Процес вирощування мікроорганізмів у ферментерах здійснюється із використанням стерильних середовищ, адже контамінація чужорідними мікроорганізмами призводить до втрати ефективності даного процесу або його повної зупинки. МС є субстратом із природною здатністю, певною мірою, вибірково забезпечувати ріст саме молочнокислих бактерій та певних видів дріжджів і нездатністю підтримувати ріст інших мікроорганізмів. Нами була проаналізована можливість використання нестерильної МС для прямого вирощування отриманих рекомбінантних штамів BRP/RFE1, оскільки сам по собі, процес стерилізації великих об'ємів середовищ для промислового мікробного синтезу є досить енергозатратним, а отже дорогим. Використання схожої 2-х етапної схеми вирощування у нестерильній МС упродовж 120 годин (у сумі) забезпечило хороший та схожий ріст біомаси у обох використаних штаммах - BRP/RFE1 і BRP. Продукція РФ також виявилась суттєвою і коливалась в межах 750 – 850 мг/л. Заключний візуальний аналіз із використанням світлової мікроскопії дозволив виявити лише поодинокі бактерійні клітини (ймовірно молочнокислі бактерії), що не могло суттєво впливати на якість проведення дріжджового вирощування.

Метою наступної частини роботи було з'ясування можливості покращення продукції РФ при використанні МС за рахунок посилення експресії гена *SEF1* під контролем лактозо-індуцибельного промотора гена *LAC4* *C. famata*. Використання такої конструкції було обрано беручи до уваги здатність даного виду дріжджів рости та продукувати РФ у МС. Як реципієнти було використано штам BRP/RFE1 та новостворений у нашій лабораторії штам BRPI *C. famata* (із

покращеним синтезом пуринів *de novo* шляхом надекспресії модифікованих генів *ADE4* і *PRS3* (Dmytruk et al., 2020). На першому етапі провели конструювання плазмиди та ввели її в геном дріжджових надсинтетиків РФ. ПЛР аналіз у реальному часі підтвердив збільшення експресії плазмиди prLAC4-SEF1 в рекомбінантних штаммах за умови використання лактозовмісних середовищ приблизно в 2 рази.

Подальший аналіз флавіногенної активності у МС засвідчив збільшення продукції РФ у 1,5 раза в сконструйованих рекомбінантах BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 та BRPI/prLAC4-SEF1 порівняно із їх реципієнтними штамми (BRP/RFE1 та BRPI, відповідно). Продукція РФ штамми BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 та BRPI/prLAC4-SEF1 сягала позначки у 1250 мг/л РФ. Одержані дані дозволяють стверджувати, що введення гену позивної регуляції флавіногенезу *SEF1* під контролем лактозо індукцйбельного промотора *LAC4* дозволяє отримати підвищені виходи РФ за умов вирощування трансформантів у МС із додаванням додаткового джерела Нітрогену. Лактозо індуквана надпродукція РФ може бути ще одним додатковим чинником покращення штамів для промислового виробництва даного вітаміну шляхом мікробного синтезу на лактозовмісних середовищах. Оскільки, існують припущення, що при досягненні певного рівня надпродукції відповідної сполуки мікроорганізмами, введення навіть сильних додаткових генів – активаторів цього синтезу, приводить лише до незначного підвищення виходу кінцевого продукту. Це мабуть пов'язано із наявністю певної межі природної чутливості продуцента до надмірної кількості синтезованого ним продукту. Тому використання індукційних промоторів та менш ефективних, проте дешевших середовищ, може частково нівелювати даний обмежуючий фактор та покращити умови для надпродукції корисної сполуки.

На третьому заключному етапі роботи ми провели конструювання принципово нового продуцента антибіотичної сполуки амінорибофлавіну (АФ),

шляхом експресії модифікованого бактерійного гена *rosB* у дріжджовому надсинтетичу флавінмононуклеотиду (ФМН) *FP C. famata*.

Як вже згадувалось вище, АФ є метаболічним попередником синтезу антибіотика розеофлавіну (РоФ) у бактерій (Schwarz et al., 2016; Schneider et al., 2020). Вибіркова цитотоксична дія АФ на патогенні бактерії робить його перспективним терапевтичним засобом для лікування ряду інфекційних захворювань, викликаних патогенними мікроорганізмами, в першу чергу, це стосується важких та поширених захворювань спричинених золотистим стафілококом (*S. aureus*) та його метицилін резистентними штамми MRSA (Wang et al., 2017; Krajewski et al., 2017).

Для одержання дріжджових продуцентів АФ було перенесено ген біосинтезу цієї сполуки у бактеріях *rosB* (кодує 8-диметил-8-амінорибофлавін-5'-фосфатсинтетазу - фермент RosB) в геном дріжджів під контролем конститутивно активного дріжджового промотора *TEF1*. Попередньо проведено синтетичну модифікацію бактерійної кодонової системи на дріжджову (дріжджовий кодон CUG кодує серин, а не лейцин, як у бактерій (Voronovsky et al., 2004; Dmytruk and Sibirny, 2012)). Оскільки АФ утворюється безпосередньо із ФМН, як реципієнтний штам було обрано дріжджовий надсинтетик ФМН *FP C. famata* (Yatsyshyn et al., 2009).

Було виявлено нову флуоресціюючу сполуку, що за місцем розташування на паперовій хроматографічній смужці відповідала опублікованому коефіцієнту затримання для АФ (retardation factor, *Rf* - 0,10) (György and Pearson, 1967; Juri et al., 1987; Tyagi et al., 2009). Остаточним підтвердженням наявності АФ у культуральному середовищі рекомбінантних штамів *FP/rosB C. famata* слугували результати проведеного сучасного високоточного аналізу мас-спектрометрії, які чітко засвідчили, що новою флавіновою сполукою є АФ.

На наступних етапах досліджень був проведений кількісний аналіз вмісту АФ у культуральних середовищах отриманих трансформантів дріжджів. Для

цього, клітини вирощували у модифікованому середовищі Беркгольдера упродовж 44 год за температури 30°C. Шляхом спектрофотометричного аналізу із урахуванням відомого для АФ коефіцієнта молекулярної екстинції (Chapman and Reid., 1999; Tyagi et al., 2009), була встановлена здатність дріжджів до продукції даної сполуки в культуральне середовище у концентрації до 5 мг/л. Також, дані результати були підтверджені за допомогою мас-спектрометрії.

Підсумовуючи одержані дані, варто зазначити, що нами вперше було успішно створено принципово нові продуценти бактерійної антибіотичної сполуки АФ у філогенетично далекому еукаріотичному виді мікроорганізмів - дріжджах. Використання дріжджів як продуцентів АФ дозволило встановити їх нечутливість та здатність до активного росту за умов синтезу та вивільнення у культуральне середовище АФ. Подальше удосконалення сконструйованих рекомбінантних штамів FP/rosB *C. famata* дозволить підвищити рівень синтезу АФ та у перспективі може слугувати платформою для створення високопродуктивного дріжджового надсинтетика цієї корисної сполуки.

Одержання значних кількостей АФ високого ступеню чистоти є одним із важливих напрямків сучасної біотехнології, мікробіології, адже дозволить налагодити виробництво нових терапевтичних засобів лікування складних інфекційних захворювань викликаних патогенами MRSA.

ВИСНОВКИ

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

Основні результати проведених досліджень представлено у наступних висновках:

1. Ідентифіковано гомолог людського гена рибофлавін-екскретази *BCRP1* (Breast Cancer Resistant Protein) – *RFE1_Dh* у дріжджів близького до *C. famata* виду *Debaryomyces hansenii*.
2. Надекспресія гена *RFE1_Dh* у надсинтетику рибофлавіну BRP *C. famata* приводить до підвищення флавіногенної активності та нагромадження цього вітаміну в середовищі. Зростання продукції рибофлавіну штамами BRP/RFE1 *C. famata* в 1,5 раза корелює з 1,5 кратним зменшенням внутрішньоклітинного вмісту цього вітаміну. Надекспресія гена *RFE1_Dh* приводить також до підвищення активності ГТФ-циклогідролази II у 2 рази та зростання рівня експресії гена *RIB1*, який кодує цей фермент.
3. Сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *C. famata*, які містять додатковий ген регуляторного транскрипційного фактора *SEF1* *C. famata* під контролем лактозо-індуцибельного промотора гена *LAC4*, що кодує β -галактозидазу. Отримані штами синтезують у 1,5 раза більше рибофлавіну порівняно із реципієнтними штамами-надсинтетиками цього вітаміну за використання молочної сироватки як культурального середовища.
4. Досліджено здатність до надсинтезу рибофлавіну сконструйованими штамами *C. famata* у разі використання різних джерел Карбону та

оптимізовано склад середовищ і умов вирощування для максимального виходу цільового продукту. Встановлено, що дешевий побічний продукт молочної промисловості - молочна сироватка є перспективним субстратом для виробництва рибофлавіну з використанням дріжджів *C. famata*.

5. Уперше, за використання гетерологічної експресії модифікованого гена *rosB* бактерій *S. davaonensis* у дріжджовому надсинтетичу флавінмононуклеотиду *C. famata* сконструйовано дріжджовий продуцент бактерійної антибіотичної сполуки – амінорибофлавіну. Отримані рекомбінантні штами нагромаджували в культуральній рідині до 5 мг/л амінорибофлавіну.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бабяк, Л. Я., Протченко, О. В., Федорович, Д. В. (2001). Координована регуляція біосинтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну) та асиміляції заліза у дріжджів. *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. Київ: Логос, 1*, 457–461.
2. Бандрин, С. В., Рабинович, П. М. Степанов, А. И. (1983). Три группы сцепления генов биосинтеза рибофлавина *Escherichia coli*. *Генетика, 19*, 1419–1425.
3. Нисио, Р., Камикубо, Т. (1970). Использование углеводов микроорганизмами. 2. Использование н-парафинов и образование витамина В₂ *Pichia guilliermondii* Wickerham. *Реферативный журнал: Биология, 17*, Реф. 17 768Ф.
4. Помозгова, И. Н., Логинова, Л. Г. (1970). Способ получения биомассы и рибофлавина. *А.с. 2750023 СССР*.
5. Прокопів, Т. М., Федорович, Д. В., Борецький, Ю. Р., Протченко О.В. (2003). Вплив металів на флавіногенез та асиміляцію заліза у дріжджів *Pichia guilliermondii*. *Фальцфейнівські читання: Збірник наукових праць*, 280–283.
6. Сибирный, А. А., Шавловский, Г. М., Кшеминская, Г. П., Орловская, А. Г. (1977а). Активный транспорт рибофлавина у дрожжей *Pichia guilliermondii*. Обнаружение и некоторые свойства криптической рибофлавинпермеазы. *Биохимия, 42*, 1841–1851.
7. Сибирный, А. А., Шавловский, Г. М., Голощапова, Г. В. (1977б) Мутанты дрожжей *Pichia guilliermondii* с множественной чувствительностью к антибиотикам и антиметаболитам. Селекция и свойства мутантов. *Генетика, 13*, 872–879.
8. Сибирный, А. А., Шавловский, Г. М., Кшеминская, Г. П., Орловская, А. Г. (1977в). О транспорте рибофлавина в клетки рибофлавинзависимых мутантов дрожжей. *Микробиология, 46*, 376–378.

9. Сибирный, А. А., Шавловский, Г. М., Кшеминская, Г. П., Орловская, А. Г. (1978). Влияние глюкозы и ее производных на системы поглощения и экскреции рибофлавина у дрожжей *Pichia guilliermondii*, *Биохимия*, 43, 1414–1423.
10. Сибирный, А. А., Шавловский, Г. М. (1981). Транспорт коферментных витаминов у дрожжей. *Успехи современной биологии*, 92, 354–364.
11. Сибирный, А. А. (1985). Генетический контроль биосинтеза и транспорта рибофлавина у дрожжей *Pichia guilliermondii*. Дис. д-ра біол. наук, Львів, 456.
12. Сибірний, А. А., Федорович, Д. В., Борецький, Ю. Р., Вороновський, А. Я. (2006). Мікробний синтез флавінів. *Київ, видавництво «Наукова думка»*, 191.
13. Тесляр, Г. Е., Шавловский, Г. М. (1983). О локализации генов, кодирующих ГТФ-циклогидролазу II и рибофлавинсинтазу на хромосоме *Escherichia coli* K-12. *Цитология и генетика*, 17, 54–56.
14. Трач, В. М., Шавловський, Г. М. (1976). Надсинтез рибофлавіну дріжджами *Schwanniomyces occidentalis*. *Доповідь академії наук УРСР. Сер. Б*, 349–351.
15. Федоренко, В. О., Осташ, Б. О., Гончар, М.В., Ребець Ю. В. (2007). Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. *Видавництво: Львівського Національного Університету ім. Івана Франка*, 279.
16. Черник, Т. П., Скворцова, А. П., Шевченко, Т. Н. (1974). Исследование оперона биосинтеза рибофлавина *Bacillus subtilis*. 6. Природа и свойства мутантов, конститутивных в присутствии флавиномононуклеотида. *Генетика*, 10, 94–101.
17. Чернюшок, О. А., Кочубей-Литвиненко, О. В., Василів, В. П., Дашковський Ю. О. (2011). Сироватка молочна – біологічно цінний продукт. *Харчова наука і технологія*, 1(14), 40–42.

18. Шавловский, Г. М., Кузнецова, Р. А. (1975). Особенности флавиногенеза и регуляции биосинтеза пуринов *de novo* у мутантов дрожжей резистентных к 8-азагуанину. *Генетика*, 11, 110–118.
19. Шавловский, Г. М., Федерович, Д. В., Звягильская, Р. А. (1976). Флавиногенный мутант дрожжей *Pichia guilliermondii* с поврежденным транспортом железа у дрожжей. *Микробиология*, 45, 313–318.
20. Шавловский, Г. М., Логвиненко, Е. М. (1988). Сверхсинтез флавинов у микроорганизмов и его молекулярные механизмы. *Прикладная биохимия и микробиология*, 24, 435–447.
21. Шавловский, Г. М., Федерович, Д. В., Бабяк, Л. Я. (1993). Влияние мутаций *rib81* на биосинтез рибофлавина и транспорт железа у дрожжей *Pichia guilliermondii*. *Микробиология*, 62, 897–904.
22. 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>
23. 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>
24. Aguiar, T.Q., Silva, R., Domingues, L. (2015). *Ashbya gossypii* beyond industrial riboflavin production: A historical perspective and emerging biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1774–1786. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.001>.
25. Anderson, F. B., Harris, G. J. (1963). The production of riboflavin and D-arabitol by *debaryomyces subglobosus*. *General Microbiology*, 33, 137–146. <https://doi.org/10.1099/00221287-33-1-137>

26. Andreieva, Y., Petrovska, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020b). 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.350>
27. Araki, S., Suzuki, M., Fujimoto, M., and Kimura, M. (1995). Enhancement of resistance to bacterial infection in mice by vitamin B₂. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57, 599–602.
28. 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>
29. 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>
30. Bacher, A. (1991). Biosynthesis of Flavins. In F. M€uller (Ed.). *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, (1st ed). CRC Press. 215–249
31. Belenky, P., Collins, J. J. (2011). Microbiology. Antioxidant strategies to tolerate antibiotics. *Science*, 334(6058), 915–916. <https://doi.org/10.1126/science.1214823>
32. Beztsinna, N., Solé, M., Taib, N., Bestel, I. (2016). Bioengineered riboflavin in nanotechnology. *Biomaterials*, 80, 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.050>
33. Bigelis, R. (1989). Industrial products of biotechnology: application of gene technology. *Biotechnology*, 7b, 243.

34. Bircsak, K. M., Aleksunes, L. M. (2015). Interaction of Isoflavones with the BCRP/ABCG2 Drug Transporter. *Current Drug Metabolism*, 16(2), 124–140. <https://doi.org/10.2174/138920021602150713114921>
35. Boretsky, Y. R., Pynyaha, Y. V., Boretsky, V. Y., Fedorovych, D. V., Fayura, L. R., Protchenko, O., Philpott, C. C., 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>
36. Bresler, S. E., Kalinin, V. L., Sukhodolova, A. T. (1972). Action of supermutagens on the transforming DNA of *Bacillus subtilis*. *Mutation Research*, 15(2), 101–112. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(72\)90023-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(72)90023-1)
37. Chapman, S. K., Welsh, F., Moysey, R., Mowat, C., Doherty, M. K., Turner, K. L., Munro, A. W., Reid, G. A. (1999). Flavocytochromes: transceivers and relays in biological electron transfer. *Biochemical Society Transactions*, 27(2), 185–189. <https://doi.org/10.1042/bst0270185>
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 and Microbe*, 10(2), 118–135. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.07.005>
39. Corredor, M., Davila, A.M., Casarégola, S., Gaillardin, C. (2003). Chromosomal polymorphism in the yeast species *Debaryomyces hansenii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84(2), 81–88. <https://doi.org/10.1023/a:1025432721866>
40. Da Silva, G. P., Mack, M., Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>
41. Demain, A. L. (1972). Riboflavin oversynthesis. *Annual Review of Microbiology*, 26, 369–388. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.26.100172.002101>

42. Demain, A. L. (1980). Microbial production of primary metabolites. *Naturwissenschaften*, 67(12), 582–587. <https://doi.org/10.1007/BF00396537>
43. 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.
44. 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>
45. 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>
46. Dmytruk, K. V., and Sibirny, A. A. (2012). *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*, 29(11), 453–458. <https://doi.org/10.1002/yea.2929>
47. 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>
48. 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>

49. 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>
50. 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>
51. 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>
52. Enary, T. M. (1955). Effect of cobalt and iron on riboflavin by *Candida guilliermondii*. *Acta Chemica Scandinavica*, 9, 1726–1729.
53. Fedorovich, D. V., Romaniuk, T. M., Protchenko, O. V., Gudz', S. P. (2000). Synergistic effect of *rib80* and hit mutations on riboflavin biosynthesis and iron transport in the yeast *Pichia guilliermondii*. *Mikrobiologiya*, 69(2), 180–184.
54. Fischer, M., and Bacher, A. (2005). Biosynthesis of flavocoenzymes. *Natural Product Reports*, 22(3), 324. <https://doi.org/10.1039/b210142b>
55. 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>
56. Förster, C., Santos, M. A., Ruffert, S., Krämer, R., and Revuelta, J. L. (1999). Physiological Consequence of Disruption of the *VMAl* Gene in the Riboflavin Overproducer *Ashbya gossypii*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9442–9448. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9442>

57. Förster, C., Revuelta, J. L., Krämer, R. (2001). Carrier-mediated transport of riboflavin in *Ashbya gossypii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), 85–89. <https://doi.org/10.1007/s002530000483>
58. Gelfand, M. S. (1999). Recognition of regulatory sites by genomic comparison. *Research in Microbiology*, 150(9-10), 755–771. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(99\)00117-5](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(99)00117-5)
59. Giri, K. V., Krishnaswamy, P. R. (1954). Studies on the synthesis of riboflavin by a mutant yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 67(3), 309–313. <https://doi.org/10.1128/jb.67.3.309-313.1954>
60. Goodsman, J. J., and Ferrera, R. R. (1954). Synthesis of Riboflavin by *Ashbya gossypii* Grown in a Synthetic Medium. *Mycologia*, 46(5), 556–563.
61. Gutmann, M., Hoischen, C., Krämer, R. (1992). Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1112(1), 115–123. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90261-j](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90261-j)
62. György, P., Pearson, W. (1967). The Vitamins: Chemistry, Physiology, Pathology, Methods. *Academic press, New York and London*, 7, 342.
63. Hanson, A. M. (1967). Microbial production of pigment and vitamins. *Microbial Technology*, 222–250.
64. Heefner, D. L., Weaver, C. A., Yarus, M. J. (1992). Method for producing riboflavin with *Candida famata*. US Patent 5, 164, 303.
65. Hemasa, A. L., Mack, M., Saliba, K. J. (2022). Roseoflavin, a Natural Riboflavin Analogue, Possesses *In Vitro* and *In Vivo* Antiplasmodial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(10), e0054022. <https://doi.org/10.1128/aac.00540-22>
66. Hemberger, S., Pedrollo, D. B., Stolz, J., Vogl, C., Lehmann, M., Mack, M. (2011). *RibM* from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter

and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. *BMC Biotechnology*, 11, 119. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-119>

67. Henriques, B. J., Olsen, R. K. J., Gomes, C. M., Bross, P. (2021). Electron transfer flavoprotein and its role in mitochondrial energy metabolism in health and disease. *Gene*, 776, 145407. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145407>

68. Jankowitsch, F., Kühm, C., Kellner, R., Kalinowski, J., Pelzer, S., Macheroux, P., Mack, M. (2011). A novel N,N-8-amino-8-demethyl-D-riboflavin Dimethyltransferase (RosA) catalyzing the two terminal steps of roseoflavin biosynthesis in *Streptomyces davawensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38275–38285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292300>

69. 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>

70. 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), 67. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-67>

71. Johnston, J. R. (1994). Molecular genetics of yeast: a practical approach. *Molecular genetics of yeast*, 89, 296–300.

72. 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>

73. Juri, N., Kubo, Y., Kasai, S., Otani, S., Kusunose, M., Matsui, K. (1987). Formation of roseoflavin from 8-amino- and 8-methylamino-8-demethyl-D-riboflavin. *The Journal of Biochemistry*, 101(3), 705–711. <https://doi.org/10.1093/jb/101.3.705>

74. Kasai, S., Kubo, Y., Yamanaka, S., Hirota, T., Sato, H., Tsuzukida, Y., Matusi, K. (1978). Anti-riboflavin activity of 8N-alkyl analogues of roseoflavin in some Gram-positive bacteria. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* (Tokyo), 24(4), 339–350. <https://doi.org/10.3177/jnsv.24.339>
75. 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>
76. Kayastha, K., Vitt, S., Buckel, W., Ermler, U. (2021). Flavins in the electron bifurcation process. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 701, 108796. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108796>
77. Keijser, B. J., van Wezel, G. P., Canters, G. W., Kieser, T., Vijgenboom, E. J. (2000). The ram-dependence of *Streptomyces lividans* differentiation is bypassed by copper. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(4), 565–574.
78. Kim, H. S., Hoja, U., Stolz, J., Sauer, G., Schweizer, E. (2004). Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of in vivo biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42445–42452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407137200>
79. Kinoshita, S. (1972). Amino-acid production by the fermentation process. *Nature*, 240(5378), 211. <https://doi.org/10.1038/240211a0>
80. Kiriya, 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>
81. Knusel, F. (1957). Biosynthesis of riboflavin in *Candida guilliermondii* (A. Cast) Langeron and Guerra and some related species; influence of trace elements, especially iron and zinc. *Archives of Microbiology*, 27(3), 219–259

82. Koltun, L. V., Shavlovskiĭ, G. M., Kashchenko, V. E., Trach, V. M. (1984). Changes in the enzyme activity of flavinogenesis in the process of culturing the fungus *Eremothecium ashbyii*. *Mikrobiologiya*, 53(1), 43–47
83. Konjik, V., Brünle, S., Demmer, U., Vanselow, A., Sandhoff, R., Ermler, U., Mack, M. (2017). The Crystal Structure of RosB: Insights into the Reaction Mechanism of the First Member of a Family of Flavodoxin-like Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition English*, 56(4), 1146–1151. <https://doi.org/10.1002/anie.201610292>
84. Krajewski, S. S., Ignatov, D., Johansson, J. (2017). Two Are Better Than One: Dual Targeting of Riboswitches by Metabolite Analogs. *Cell Chemical Biology*, 24(5), 535–537. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.004>
85. Kreneva, R. A., Perumov, D. A. (1990). Genetic mapping of regulatory mutations of *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Molecular Genetics and Genomics*, 222(2-3), 467–469. <https://doi.org/10.1007/BF00633858>
86. Kumánovics, A., Chen, O. S., Li L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., Dingra, N. N., Outten, C. E., Keller, G., Winge, D., Ward, D. M., Kaplan, J. (2008). Identification of *FRA1* and *FRA2* as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10276–1086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801160200>
87. Kundu, B., Sarkar, D., Ray, N., Talukdar, A. (2019). Understanding the riboflavin biosynthesis pathway for the development of antimicrobial agents. *Medicinal Research Reviews*, 39(4), 1338–1371. <https://doi.org/10.1002/med.21576>
88. Le Blanc, J. G., Levit, R., Savoy de Giori, G., de Moreno de LeBlanc, A. (2020). Application of vitamin-producing lactic acid bacteria to treat intestinal inflammatory diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(8), 3331–3337. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10487-1>

89. Ledesma-Amaro, R., Serrano-Amatriain, C., Jiménez, A., and Revuelta, J. L. (2015). Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbya gossypii* through pathway optimization. *Microbial Cell Factories*, 14, 163–171. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0354-x>
90. Ledesma-Amaro, R., Buey, R. M., Revuelta, J. L. (2016). The filamentous fungus *Ashbya gossypii* as a competitive industrial inosine producer. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(9), 2060–2063. <https://doi.org/10.1002/bit.25965>
91. Lee, E. R., Blount, K. F., Breaker, R. R. (2009). Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. *RNA Biology*, 6(2), 187–194. <https://doi.org/10.4161/rna.6.2.7727>
92. Lei, J., Xin, C., Xiao, W., Chen, W., Song, Z. (2021). The promise of endogenous and exogenous riboflavin in anti-infection. *Virulence*, 12(1), 2314–2326. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1963909>
93. Liesegang, A., Fritsche, W., Schlee, D., Reinbothe, H. (1971). Purine metabolism and riboflavin biosynthesis in microorganisms. IV. Storing of riboflavin in the cells of *Candida guilliermondii* (Cast.) *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 11(2), 121–130. <https://doi.org/10.1002/jobm.3630110207>
94. 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.
95. Liu, S., Hu, W., Wang, Z., Chen, T. (2020). Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. *Microb Cell Fact*, 19(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01302-7>
96. Liu, Y., Zhang, Q., Qi, X., Gao, H., Wang, M., Guan, H., Yu, B. (2023). Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* for Riboflavin Production: A Review. *Microorganisms*, 11(1), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010164>

97. 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.
98. Logvinenko, E. M., Shavlovskiy, G. M., Zakal'skiĭ, A. E., Samarskiĭ, V. A. (1989). Regulation of the activity and synthesis of enzymes participating in the formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine, a riboflavin precursor in yeast. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, 61(1), 28–32.
99. Mack, M., van Loon, A., 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>
100. Maeting, I., Schmidt, G., Sahm, H., Revuelta, J. L., Stierhof, Y. D., Stahmann, K. P. (1999). Isocitrate lyase of *Ashbya gossypii*-transcriptional regulation and peroxisomal localization. *FEBS Letters*, 444(1), 15–21. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00017-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00017-4)
101. 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>
102. Mao, Q., Unadkat, J. D. (2015). Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 17(1), 65–82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
103. Mateos, L., Jiménez, A., Revuelta, J. L., Santos, M. A. (2006). Purine biosynthesis, riboflavin production, and trophic-phase span are controlled by a *Myb*-related transcription factor in the fungus *Ashbya gossypii*. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 5052–5060. <https://doi.org/10.1128/AEM.00424-06>
104. Matsui, K., Juri, N., Kubo, Y., Kasai, S. (1979). Formation of roseoflavin from guanine through riboflavin. *The Journal of Biochemistry*, 86(1), 167–175.

105. Mayer, R. L., Rodbart, M. (1946). Production of vitamin B₂ by *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 51, 568.
106. Mazur-Bialy, A. I., Buchala, B., 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>
107. Mehendale-Munj, S., Sawant, S. (2021) Breast Cancer Resistance Protein: A Potential Therapeutic Target for Cancer. *Current Drug Targets*, 22(4), 420–428. <https://doi.org/10.2174/1389450121999201125200132>.
108. Merino, G., Alvarez, A. I., Pulido, M. M., Molina, A. J., Schinkel, A. H., Prieto, J. G. (2006). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(4), 690–695. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008219>
109. Merino, G., Perez, M., Real, R., Egido, E., Prieto J. G., Alvarez, A. I. (2010). In vivo inhibition of BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: a comparative study in *Bcrp1* (-/-) mice. *Pharmaceutical Research*, 27(10), 2098–2105. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0208-5>
110. Meruvu, H., Dos Santos, J. C. (2021). Colors of life: a review on fungal pigments. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(8), 1153–1177. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1901647>
111. 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>
112. 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. *Doklady Biochemistry*, 305, 79–83.

113. 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)
114. Monschau, N., Sahm, H., Stahmann, K. (1998). Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhanced riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4283–4290. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.11.4283-4290.1998>
115. Nafady, N. A., Bagy, M. M., Abd-Alla, M. H., Morsy F. M., and Mahmoud G. A. (2015). Improvement of medium components for high riboflavin production by *Aspergillus terreus* using response surface methodology. *Rendiconti Lincei*, 26(3), 1–25. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0449-7>
116. Nakajima, K., Minematsu, M. (2004) Enzymatic studies of riboflavin oversynthesis in *Eremothecium ashbyii*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 50(3), 155–160. <https://doi.org/10.3177/jnsv.50.155>
117. Olczyk, C. (1978). N-alkanes as a substratum for riboflavin production. I. Investigations of the dynamics of the flavinogenesis in chosen yeasts of the genus *candida*. *Polish journal of pharmacology*, 30(1), 83–88.
118. Olfat, N., Ashoori, M., Saedisomeolia, A. (2022). Riboflavin is an antioxidant: a review update. *British. Journal of Nutrition*, 128(10), 1887–1895. <https://doi.org/10.1017/S0007114521005031>
119. Otani, S., Takatsu, M., Nakano, M., Kasai, S., Miura, R. (1974). Letter: Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 27(1), 86–87.
120. Otani, S., Kasai, S., Matsui, K. (1980). Isolation, chemical synthesis, and properties of roseoflavin. *Methods in Enzymology*, 66, 235–241. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(80\)66464-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(80)66464-7)
121. Ott, E., Stolz, J., Lehmann, M., Mack, M., (2009). The RFN riboswitch of *Bacillus subtilis* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis*. *RNA Biology*, 6(3), 276–280. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8342>

122. Ozbas, M. T. (1992). Microbial production of vitamin B2. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, Spec No, 259–262.
123. Pedrolli, D. B., Nakanishi, S., Barile, M., Mansurova, M., Carmona, E. C., Lux, A., Gärtner, W., Mack, M. (2011). The antibiotics roseoflavin and 8-demethyl-8-amino-riboflavin from *Streptomyces davawensis* are metabolized by human flavokinase and human FAD synthetase. *Biochemical Pharmacology*, 82(12), 1853–1859. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.08.029>
124. Pedrolli, D. B., Jankowitsch, F., Schwarz, J., Langer, S., Nakanishi, S., Frei, E., Mack, M. (2013). Riboflavin analogs as anti-infectives: occurrence, mode of action, metabolism and resistance. *Current Pharmaceutical Design*, 19(14), 2552–2560. <https://doi.org/10.2174/1381612811319140006>
125. Pedrolli, D. B., Jankowitsch, F., Schwarz, J., Langer, S., Nakanishi, S., Mack, M. (2014). Natural riboflavin analogs. *Methods in Molecular Biology*, 1146, 41–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0452-5_3
126. Perkins, J. B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chatterjee, N. P., Williams, V., Rufo, G. A., Hatch R., and Pero, J. (1999). Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 8–18. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900587>
127. Perkins, J. B., Pero, J. G. (2001). Vitamin biosynthesis. *Bacillus subtilis* and Its relatives: From Genes to Cells. *American Society for Microbiology*, 279–293.
128. Perl, M., Kearney, E. B., Singer, T. P. (1976). Transport of riboflavin into yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 251(11), 3221–3228.
129. Pescuma, M., de Valdez, G. F., Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6183–6196. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6766-z>
130. Peterson, C. T., Rodionov, D. A., Osterman, A. L., Peterson, S. N., (2020). B Vitamins and Their Role in Immune Regulation and Cancer. *Nutrients*, 12(11), 3380. <https://doi.org/10.3390/nu12113380>

131. Pires, A. F., Marnotes, N. G., Bella, A., Viegas, J., Gomes, D. M., Henriques, M. H., Pereira, C. J. (2021). Use of ultrafiltrated cow's whey for the production of whey cheese with Kefir or probiotics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(2), 555–563. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10667>
132. Plantone, D., Pardini, M., Rinaldi, G. (2021). Riboflavin in Neurological Diseases: A Narrative Review. *Clinical Drug Investigation*, 41(6), 513–527. <https://doi.org/10.1007/s40261-021-01038-1>
133. 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>
134. Prazeres, A. R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
135. Prokopiv, T. M., Fedorovych, D. V., Boretsky, Y. R., Sibirny, A. A. (2013). Oversynthesis of riboflavin in the yeast *Pichia guilliermondii* is accompanied by reduced catalase and superoxide dismutases activities. *Current Microbiology*, 66(1), 79–87. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0242-0>
136. Protchenko, O. V., Boretsky, Y. R., Romanyuk, T. M., Fedorovych, D. V. (1999). Oversynthesis of riboflavin by yeast *Pichia guilliermondii* in response to oxidative stress. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, 72(2), 19–23.
137. Pynyaha, Y. V., Boretsky, Y. R., Fedorovych, D. V., Fayura, L. R., Levkiv, A. I., Ubiyvovk, V., M., Protchenko, O. V., Philpott, C. C., Sibirny, A. A. (2009). Deficiency in frataxin homologue *YFHI* in the yeast *Pichia guilliermondii* leads to missregulation of iron acquisition and riboflavin biosynthesis and affects sulfate assimilation. *Biometals*, 22(6), 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9256-x>
138. Rabinovich, P. M., Iomantas, I. V., Khaĩkinson, M. I., Stepanov, A. I. (1984). Cloning of genetic material in *Bacillus*. *Molecular Biology (Mosk)*, 18(1), 189–196.
139. Reihl, P., Stolz, J. (2005). The monocarboxylate transporter homolog Mch5p catalyzes riboflavin (vitamin B₂) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of*

- Biological Chemistry*, 280(48), 39809–39817.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M505002200>
140. Revuelta, J. L., Ledesma-Amaro, R., Lozano-Martinez, P., Díaz-Fernández, D., Buey, R.M., Jiménez, A. (2017). Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(4-5), 659–665.
<https://doi.org/10.1007/s10295-016-1842-7>
141. Saedisomeolia, A., Ashoori, M., (2018). Riboflavin in Human Health: A Review of Current Evidences. *Advances in Food and Nutrition Research*, 83, 57–81.
<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.11.002>
142. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, (1), Cold Spring Harbor Laboratory.
143. Santibanez, C., Varnero, M. T., and Bustamante, M. (2011). Residual Glycerol from Biodiesel Manufacturing, Waste or Potential Source of Bioenergy: A Review. *Chilean journal of agricultural research*, 71(3), 469–475.
<https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000300019>
144. 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>
145. Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Hochuli, M., Szyperski, T., Wüthrich, K. (1997). Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnology*, 15(5), 448–452. <https://doi.org/10.1038/nbt0597-448>
146. Schlüpen, C., Santos, M. A., Weber, U., de Graaf, A., Revuelta, J. L., Stahmann P. (2003). Disruption of the *SHM2* gene, encoding one of two serine hydroxymethyltransferase isoenzymes, reduces the flux from glycine to serine in *Ashbya gossypii*. *Biochemical Journal*, 369(Pt 2), 263–273.
<https://doi.org/10.1042/BJ20021224>

147. Schmidt, G., Stahmann, K. P., Kaesler, B., Sahm, H. (1996). Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology*, 142(2), 419–426. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-2-419>
148. Schneider, C., Konjik, V., Kißling, L., Mack, M. (2020). The novel phosphatase RosC catalyzes the last unknown step of roseoflavin biosynthesis in *Streptomyces davaonensis*. *Molecular Microbiology*, 114(4), 609–625. <https://doi.org/10.1111/mmi.14567>
149. Schwarz, J., Konjik, V., Jankowitsch, F., Sandhoff, R., Mack, M. (2016). Identification of the Key Enzyme of Roseoflavin Biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 55(20), 6103–6106. <https://doi.org/10.1002/anie.201600581>
150. 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>
151. Semkiv, M. V., Ruchala, J., Dmytruk, K. V., Sibirny, A. A. (2020). 100 Years Later, What Is New in Glycerol Bioproduction? *Trends in Biotechnology*, 38(8), 907–916. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.001>
152. Serganov, A., Huang, L., Patel, D. J. (2009). Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature*, 458(7235), 233–237. <https://doi.org/10.1038/nature07642>
153. Shavlovskiy, G. M. (1958). Stimulation of riboflavin synthesis in yeasts *Candida guilliermondii* in the presence of iron in culture medium *Mikrobiologiya*, 27(6), 692–697.
154. Shavlovsky, G. M., Sibirny, A. A., Ksheminskaya, H. P. (1977). Permease and excretase for riboflavin in the mutant of *Pichia guilliermondii* yeast. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 171, 139–145.

155. Shavlovskiy, 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.
156. 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>
157. Shavlovskiy, G. M., Tesliar, G. E., Strugovshchikova, L. P. (1982). Flavinogenesis regulation in riboflavin-dependent *Escherichia coli* mutants. *Mikrobiologiya*, 51(6), 986–992.
158. Shavlovskiy, G. M., Babiak, L., Sibirnyi, A. A., Logvinenko, E. M. (1985). Genetic control of riboflavin biosynthesis in *Pichia guilliermondii* yeasts. The detection of a new regulator gene RIB81. *Genetika*, 21(3), 368–374.
159. Shavlovskiy, G. M., Logvinenko, E. M. (1988). Supersynthesis of flavins in microorganisms and its molecular mechanism (review of the literature). *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 24(4), 435–447.
160. Shavlovskiy, 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.
161. Shey, M. S., Balfour, A., Wilkinson, K. A., Meintjes, G. (2018). Contribution of APCs to mucosal-associated invariant T cell activation in infectious disease and cancer. *Innate Immunity*, 24(4), 192–202. <https://doi.org/10.1177/1753425918768695>
162. Shukla, J. P., Prabku, K. A. (1961). Studies in the production of riboflavin by *Aspergillus niger*. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 40, 20–24.

163. Sibirny, A. A., Shavlovsky, G. M., (1984). Identification of regulatory genes of riboflavin permease and α -glucosidase in the yeast *Pichia guilliermondii*. *Current Genetics*, 8(2), 107–114. <https://doi.org/10.1007/BF00420228>
164. Smith, C. G., Smith, G. A., Papadoupoulou Z. (1961). Effect of surface active agents on the biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 47(2), 344–349.
165. Smith, E. H., Lu, W., Vengris, T., Binkiene, R. (1996). Sorption of heavy metals by Lithuanian glauconite. *Water Research*, 30(12), 2883–2892. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00004-8)
166. 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>
167. 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>
168. Stenchuk, N. N., Kutsiaba, V. I., Kshanovskaia, B. V., Fedorovich, D. V. (2001). Effect of *rib83* mutation on riboflavin biosynthesis and iron assimilation in *Pichia guilliermondii*. *Mikrobiologiia*, 70(6), 753–758.
169. Straube, G. (1984). Riboflavin uptake and accumulation by cells of the flavinogenic yeast *Pichia (Candida) guilliermondii*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 24, 341–344.
170. Straus, D., Ausubel, F. M. (1990). Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 87(5), 1889–1893. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1889>

171. 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>
172. Szcześniak, T., Karabin, L., Szczepankowska, M., Wituch, K. (1971a). Biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. I. The influence of fats of the animal origin on the riboflavin production. *Acta Physica Polonica B*, 3(1), 29–34.
173. Szcześniak, T., Karabin, L., Szczepankowska, M., Wituch, K. (1971b). Biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. II. The influence of animal proteins on the riboflavin biosynthesis. *Acta Physica Polonica B*, 3(2), 91–95.
174. Takao, S. (1964). Comparison of riboflavin-producing abilities of *Candida robusta* and *Candida guilliermondii* and some conditions for its production. *Agricultural and Biological Chemistry*, 28, 566–570.
175. Tanaka, M., Nakamura, N. (1966). Flavin adenine dinucleotide by fermentation. *Chemical Abstracts*, 65, 16829.
176. 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>
177. Thakur, K., Tomar, S. K., Singh, A. K., Mandal, S., Arora, S. (2017). Riboflavin and health: A review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3650–3660. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1145104>
178. Tolomeo, M., Nisco, A., Barile, M. (2021). Alteration of Flavin Cofactor Homeostasis in Human Neuromuscular Pathologies. *Methods in Molecular Biology*, 2280, 275–295. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6_18
179. Tongsook, C., Uhl, M. K., Jankowitsch, F., Mack, M., Gruber, K., Macheroux, P. (2016). Structural and kinetic studies on RosA, the enzyme catalysing the

methylation of 8-demethyl-8-amino-d-riboflavin to the antibiotic roseoflavin. *FEBS Journal*, 283(8), 1531–1549. <https://doi.org/10.1111/febs.13690>

180. 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>

181. 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>

182. Tyagi, A., Zirak, P., Penzkofer, A., Mathes, T., Hegemann, P., Mack, M., Ghisla, S. (2009). Absorption and emission spectroscopic characterisation of 8-amino-riboflavin. *Chemical Physics*, 364, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2009.08.005>

183. Urits, I., Gress, K., Charipova, K., Zamarripa, A. M., Patel, P. M., Lassiter, G., Jung, J. W., Kaye, A. D., Viswanath O. (2020). Pharmacological options for the treatment of chronic migraine pain. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*, 34(3), 383–407. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2020.08.002>

184. Van Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J. W., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. (2007). Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B₂) into milk. *Molecular and Cellular Biology*, 27(4), 1247–1253. <https://doi.org/10.1128/MCB.01621-06>

185. Veldcamp, H., Venema, P. A., Harder, W., Konings W. N. (1966). Production of riboflavin by *Arthrobacter globiformis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 107–113.

186. 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>
187. Voronovskiy, A., Beburov, M., Shavlovskii, G. M. Logvinenko, E. M., Stasiv, I., Zlochevskiy, M. L., (1993). Cloning of the *RIB7* gene encoding the riboflavin synthase of the yeast *Pichia guilliermondii*. *Genetika*, 29(6), 922–927.
188. 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)
189. 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>
190. Wang M, Zhang W, Wang N. (2022). Covalent flavoproteins: types, occurrence, biogenesis and catalytic mechanisms. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 20(10), 749–760. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(22\)60194-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(22)60194-8).
191. Wang, H., Mann, P. A., Xiao, L., Gill, C., Galgoci, A. M., Howe, J. A., Villafania, A., Barbieri, C. M., Malinverni, J. C., Sher, X., Mayhood, T., McCurry, M. D., Murgolo, N., Flattery, A., Mack, M., Roemer, T. (2017). Dual-Targeting Small-Molecule Inhibitors of the *Staphylococcus aureus* FMN Riboswitch Disrupt Riboflavin Homeostasis in an Infectious Setting. *Cell Chemical Biology*, 24(5), 576–588. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.014>
192. Wang, J. J., Pan, T. M. (1994). Fermentative production of vitamin B₂ by *Candida guilliermondii*. *Fermentation Chemistry*, 22, 13.
193. Weimar, W. R., Neims, A. H. (1975). Physical and Chemical Properties of Flavins; Binding of Flavins to Protein and Conformational Effects; Biosynthesis of

Riboflavin. In: Rivlin, R.S. (eds) *Riboflavin*. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4419-3_1

194. Westman, J. O., Ylittero, P., Franzén, C. J., Taherzadeh, M. J. (2012). Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1441–1454. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4517-y>

195. Wilson, A. C., Pardee, A. B. (1962). Regulation of flavin synthesis by *Escherichia coli*. *The Journal of General Microbiology*, 28, 283–303. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-2-283>

196. Yamasaki, I., Yosimoto, W. (1938). Über die Flavinarung der Aceton-Butylalkoholbakterien. *Biochemische Zeitschrift*, 297, 398.

197. Yatsyshyn, V. Y., Fedorovych, D. V., Sibirny, A. A. (2014). Metabolic and bioprocess engineering of the yeast *Candida famata* for FAD production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(5), 823–835. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1422-7>

198. Yatsyshyn, V. Y., Ishchuk, O. P., Voronovsky, A. Y., Fedorovych, D. V., Sibirny, A. A. (2009). Production of flavin mononucleotide by metabolically engineered yeast *Candida famata*. *Metabolic Engineering*, 11(3), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.01.004>

199. You, J., Pan, X., Yang, C., Du, Y., Osire, T., Yang, T., Zhang, X., Xu, M., Xu, G., 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>

200. You, J., Du, Y., Pan, X., Zhang, X., Yang, T., Rao, Z. (2022). Increased Production of Riboflavin by Coordinated Expression of Multiple Genes in Operons in *Bacillus subtilis*. *ACS Synthetic Biology*, 11(5), 1801–1810. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00640>

201. Zhang, M., Zhao, X., Chen, X., Li, M., Wang, X. (2021). Enhancement of riboflavin production in *Bacillus subtilis* via *in vitro* and *in vivo* metabolic engineering of pentose phosphate pathway. *Biotechnology Letters*, 43(12), 2209–2216. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03190-2>
202. 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>
203. Zumwalde, N. A., Gumperz, J. E. (2020). Mucosal-Associated Invariant T Cells in Tumors of Epithelial Origin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1224, 63–77. <https://doi.org/10.10>

Список публікацій здобувача:

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

1. Ruchala J, Andreieva Y, **Tsyurulnyk A**, Sobchuk S, Najdecka A, Wen L, Kang Y, Dmytruk O, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. Cheese whey supports high riboflavin synthesis by the engineered strains of the flavinogenic yeast *Candida famata*. Microb Cell Fact. 2022; 21(1):161-169.
2. **Tsyurulnyk A**, Fedorovych D, Dmytruk K, Sibirny A. Overexpression of Riboflavin Excretase Enhances Riboflavin Production in the Yeast *Candida famata*. Methods Mol Biol. 2021; 2280:31-42.
3. **Tsyurulnyk A**, Andreieva Y, Ruchala J, Fayura L, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. Expression of yeast homolog of the mammal *BCRP* gene coding for riboflavin efflux protein activates vitamin B2 production in the flavinogenic yeast *Candida famata*. Yeast. 2020; 37 (9-10):467-473
4. **Tsyurulnyk A**, Kordiaka R, Dmytruk K, Fedorovych D, Sybirny A. Optimization of the cultivation conditions and the basic molecular tools for roseoflavin producer *Streptomyces davawensis*. Mikrobiol Z. 2016; 78(4):2-10.
5. **Цирульник А**, Дмитрук К, Федорович Д, Сибірний А. Розробка платформи для конструювання надпродуцентів амінорибофлавіну на основі флавіногенних дріжджів *Candida famata*. Вісник Львівського університету. 2016; (73):336-341.
6. **Цирульник А**, Федорович Д, Колодій О, Дмитрук К, Сибірний А. Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну). Пат. на винахід 122821 Україна, МПК С12N1/19

- C12P 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. - №a201811788; заявл. 29.11.2018; опубл. 06.01.2021, Бюл. № 1.
7. **Цирульник А**, Федорович Д, Колодій О, Дмитрук К, Сибірний А. Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну). Пат. на корисну модель 133594 Україна, МПК C12N1/19 C12P 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. -№u201811789; заявл. 29.11.2018; опубл. 10.04.2019, Бюл. № 7.
 8. Дмитрук К, Сибірний А, Фаюра Л, Федорович Д, **Цирульник А**. Спосіб отримання флавінового антибіотика амінорибофлавіну. Пат. на корисну модель 152271 Україна, МПК C12N1/19 C12P 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. -№u202201605; заявл. 18.05.2022; опубл. 11.01.2023, Бюл. № 2.
 9. **Tsyrlunyk A**, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. Yeast *Candida famata* as a producer of riboflavin and its derivatives. 7 th international Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P.34.
 10. Fedorovych D, **Tsyrlunyk A**, Kolodii O, Boretsky Y, Dmytruk K, Sibirny A. Expression of putative riboflavin excretase *BCRP* in the flavinogenic yeasts. International Conference: Advances in Microbiology and Biotechnology; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P.61.
 11. Kolodii O, **Tsyrlunyk A**, Boretsky Y, Dmytruk K, Fayura L, Fedorovych D, Sibirny A. Cloning and expression of putative riboflavin excretase in flavinogenic yeasts. Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 96.
 12. Ruchala J, **Tsyrlunyk A**, Dmytruk K, Fedorovych D, Marx H, Mattanovich D, Sibirny A. Introduction of *Streptomyces davawensis* *rosb* gene into riboflavin producing yeast *Candida famata* and *Komagataella phaffii*. Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 123.
 13. Fedorovych D, Dmytruk K, Boretsky Y, **Tsyrlunyk A**, Ruchala J, Pavliukh K, Sibirny A. Gene *BCRP* coding for riboflavin excretase is important for

- improvement of riboflavin production in yeast. *Medical and Clinical Chemistry*. 2019; 21: 289-290.
14. Fedorovych D, Dmytruk K, **Tsyurulnyk A**, Ruchala J, Pavliukh K, Sibirny A. New approaches to improve riboflavin production in the yeast *Candida famata*. 6-th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18-20; Yaremche, Ukraine.
 15. **Tsyurulnyk A**, Fedorovych D, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Riboflavin excretase is important for riboflavin overproduction in the flavinogenic yeast *Candida famata*. 8-th Congress of European Microbiologists; 2019 July 7-11; Glasgow, Scotland.
 16. Sibirny A, Fedorovych D, Fayura L, **Tsyurulnyk A**, Andreyeva Y, Petrovska Y, Ruchala J, Dmytruk K. Construction of the advanced producer of riboflavin on whey and lignocellulose hydrolyzate in the flavinogenic yeast *Candida famata*. The 35th International Specialised Symposium on Yeasts (ISSY35); 2019 October 21-25; Antalya, Turkey.
 17. Fedorovych D, **Tsyurulnyk A**, Motyka O, Fayura L, Dmytruk K, Chshanovski G, Broda D, Ruchala J, Sibirny A. Construction of aminoriboflavin producers of the yeast *Candida famata*, purification of antibiotic and its biological activity assay. International BioThreat Reduction Symposium; 2021 June 29 - July 2; online.
 18. Fedorovych D, **Tsyurulnyk A**, Ruchala J, Vojtun A, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of the Advanced Producer of Riboflavin on Whey in the Flavinogenic Yeast *Candida famata*. World Microbe Forum; 2021 June 20-24; online.