■ ОРИГІНАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 579.222+577.214:577.164.1

ГЕНИ *SEF1* ТА *VMA1* РЕГУЛЮЮТЬ БІОСИНТЕЗ РИБОФЛАВІНУ У ФЛАВІНОГЕННИХ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA*

Ю.А. АНДРЕЄВА [1], О.О. ЛИЗАК [2], ВЕН ЛЮ [1, 3], ІНЬЦЯН КАН [3], К.В. ДМИТРУК [1], А.А. СИБІРНИЙ [1, 4]

[1] Інститут біології клітини Національної академії наук України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна
[2] Інститут біохімії Макса Планка, Ам Клопфершпіц 18, 82152 Мартінсрід, Німеччина
[3] Медичний університет Гуйчжоу, Гуйанг, Гуйчжоу, 550025 Китай
[4] Жешівський університет, Зельверовича 4, 35-601 Жешув, Польща

E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

Рибофлавін (вітамін B_2) – важливий компонент раціону живих організмів адже є попередником флавінових коферментів ФМН (флавінмононуклеотид) та ФАД (флавінаденіндинуклеотид), які, у свою чергу, залучені у багатьох важливих ферментативних реакціях. Відомо, що за умов нестачі заліза у середовищі, флавіногенні дріжджі Candida famata надпродукують рибофлавін, але досі не досліджено регуляцію цього процесу. Встановлено, що делеція гена SEF1, що кодує транскрипційний активатор, блокує здатність дріжджів до надпродукції рибофлавіну за умов дефіциту заліза. Виявлено, що SEF1 промотори з інших флавіногенних дріжджів (Candida albicans і Candida tropicalis), поєднані з ВРЗ SEF1 гена з C. famata здатні відновлювати надсинтез рибофлавіну в мутанта sef1Δ. Встановлено, що пошкодження гена VMA1 (кодує субодиницю А вакуолярної АТФ-ази) веде до надсинтезу рибофлавіну у C. famata за умов нормального збагачення середовища залізом.

Ключові слова: рибофлавін, *Candida famata, VMA1, SEF1,* дріжджі.

Вступ. Вітамін B_2 (рибофлавін, або лактофлавін) відіграє важливу роль в організмі людини та тварин. Рибофлавін є попередником ФМН та ФАД, що залучені в численні ферментативні реакції. Тварини, на відміну від рослин, грибів та більшості прокаріотів, не здатні синтезувати цю сполуку [1, 2]. Зважаючи на це, вивчення та вдосконалення процесів продукції рибофлавіну у промисловому масштабі є актуальним завданням. Рибофлавін можна отримувати як хімічним так і мікробним синтезом. Останній спосіб має певні переваги, зокрема, зменшення кількості відходів, енергозатрат та використання відновлюваних ресурсів, таких як цукри чи рослинна олія [2–4]. Рибофлавін виробляється в значних кількостях. У 2012 р. кількість синтезованого рибофлавіну сягала 9000 т. Основним виробником рибофлавіну є китайська компанія Hubei Guangji Pharmaceutical. Вітамін B_2 також виробляється у інших країнах Азії та Європи фірмами BASF, Aventis, Daicel, DSM, Kyowa, Mitsui, Roche та Takeda. Близько 70 % рибофлавіну використовується у тваринництві як додаток до кормів сільськогосподарських тварин (свині та домашня птиця). Решта 30 % рибофлавіну використовується у харчовій промисловості як барвник, а також у медицині у складі полівітамінних сумішей та препаратів для лікування мігрені, малярії, захворювання очей та шкіри, а також нервових розладів. Світовий ринок рибофлавіну становить 200–230 млн доларів на рік в залежності від ціни різних препаратів цього вітаміну (вартість кормового рибофлавіну становить близько 15–20 доларів/кг, харчового – 35–50 доларів/кг) [5]. На сьогодні, хімічний синтез вітаміну B_2 повністю заміщено мікробним синтезом [6]. У промисловому виробництві рибофлавіну використовують рекомбінантні штами грам-позитивних бактерій *Bacillus subtilis* та міцеліальних грибів *Ashbya gossypii* [1, 7]. Серед активних продуцентів рибофлавіну вирізняються також

© Ю.А. АНДРЕЄВА, О.О. ЛИЗАК, ВЕН ЛЮ, ІНЬЦЯН КАН, К.В. ДМИТРУК, А.А. СИБІРНИЙ, 2020

флавіногенні дріжджі *C. famata,* що накопичують близько 21 г/л цього вітаміну [1, 3]. Проте, промислове виробництво рибофлавіну мутантними штамами *C. famata* було призупинене через низьку генетичну стабільність продуцентів [1]. Втім, дріжджі характеризуються низкою переваг перед іншими флавіногенни-ми організмами, зокрема, використання дешевих середовищ для культивування, здатність накопичувати велику біомасу, стійкість до фагової інфекції, продукція рибофлавіну у стадії росту. Використовуючи поєднання методів класичної селекції та метаболічної інженерії, на основі *C. famata* було сконстру-йовано стабільний надпродуцент рибофлавіну *C. famata* AF-4.

Відомо, що у флавіногенних дріжджів *Candida albicans* існує система транскрипційних факторів, що регулює гомеостаз заліза та включає в себе Sef1 (Zn_2Cys_6 ДНК-зв'язуючий білок), Sfu1 (GATA фактор), та Hap43 (CCAAT-зв'язуючий комплекс). В умовах нормального збагачення середовища залізом Sef1 та Hap43 інгібуються Sfu1. Отже, останній захищає патогенні клітини від токсичного рівня іонів Феруму у крові, репресуючи гени, залучені у процеси поглинання заліза [8]. Для підвищення продукції рибофлавіну штам AF-4 було використано як вихідний для клонування додаткової копії гена *SEF1* (транскрипційний фактор та позитивний регулятор синтезу рибофлавіну) із флавіногенних дріжджів *Debaryomyces hansenii* CBS767 [9–11]. Однак цей штам поступається промисловим штамам *B. subtilis* та *A. gossypii*. Передбачається, що вивчення процесів регуляції біосинтезу рибофлавіну допоможе вдосконалити існуючий продуцент *C. famata*.

Серед регуляторних генів значну увагу привертає також *VMA1*, що кодує субодиницю А вакуолярної АТФ-ази у флавіногенних дріжджів *P. guilliermondii* [12] та міцеліальних грибів *Ashbya gossypii* [13]. На жаль, роль Vma1 у синтезі рибофлавіну досі не досліджена [1].

У даній роботі описано конструювання штамів *C. famata*, що містять ВРЗ *SEF1 C. famata* під контролем промоторів цього гена різних флавіногенних (*C. famata, C. albicans, Candida tropicalis*) та нефлавіногенних (*Pichia stipitis, Saccharomyces cerevisiae*) видів дріжджів. Експериментально доведено, що промотори гена *SEF1 C. albicans* та *C. tropicalis*, відновлюють надсинтез рибофлавіну у мутанта *sef1*Δ C. *famata*, тоді як промотори гена *SEF1 P. stipitis* та *S. cerevisiae* до відновлення надсинтезу вітаміну B_2 нездатні. До того ж, нами отримано штам *C. famata* з делецією гена *VMA1*, що виявляє підвищену продукцію рибофлавіну за умов нормального збагачення залізом в середовищі.

Матеріали та методи. *Штами, середовища та умови культивування.* Штами *C. famata* VKMY-9 (зі Всеросійської колекції мікроорганізмів, Пущино, Росія) та L20105 (*leu2*) [14] були використані у цій роботі та вирощувалися при 30 °C на багатому (YPD) середовищі, що містить пептон (1 %), дріжджовий екстракт (1 %) та глюкозу (2 %) або мінеральне (YNB) середовище, що містить стандартне мінімальне середовище (1,7 г/л), амоній сульфат (0,5 %), глюкозу (2 %). Кінцева концентрація лейцину в YNB становила 40 мг/л. Для селекції дріжджових трансформантів використовували середовище YPD із антибіотиками у концентраціях: 4 мг/л норзеотрицину та 3 мг/л флеоміцину. Дріжджі *C. albicans* SC5314, *C. tropicalis* MYA-3404, *P. stipitis* CBS6054, *S. cerevisiae* S288C також культивували на YPD для виділення геномної ДНК.

Штам *Escherichia coli* DH5α [Φ80d*lac*ZΔM15, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17(r^-_K m^+_K), *supE*44, *relA*1, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)U169] використовували для конструювання плазмід. DH5α вирощували при 37 °C на середовищі LB [15]. Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

Молекулярно-біологічні методики. У роботі використано базові молекулярно-генетичні методи [15]. Геномну ДНК *C. famata, C. albicans, C. tropicalis, P. stipitis* та *S. cerevisiae* було виділено, використовуючи Wizards Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції та ДНК-лігаза були використані відповідно до рекомендацій виробника. Виділення ДНК з *E. coli* здійснювали за допомогою Wizards Plus SV Minipreps DNA Puriafication System (Promega, Madison, WI, USA). ПЛР-ампліфікацію фрагментів здійснено, використовуючи Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) відповідно до рекомендацій виробника. ПЛР проводили з використанням термоциклеру GeneAmps PCR System 9700 (Applied Biosys-

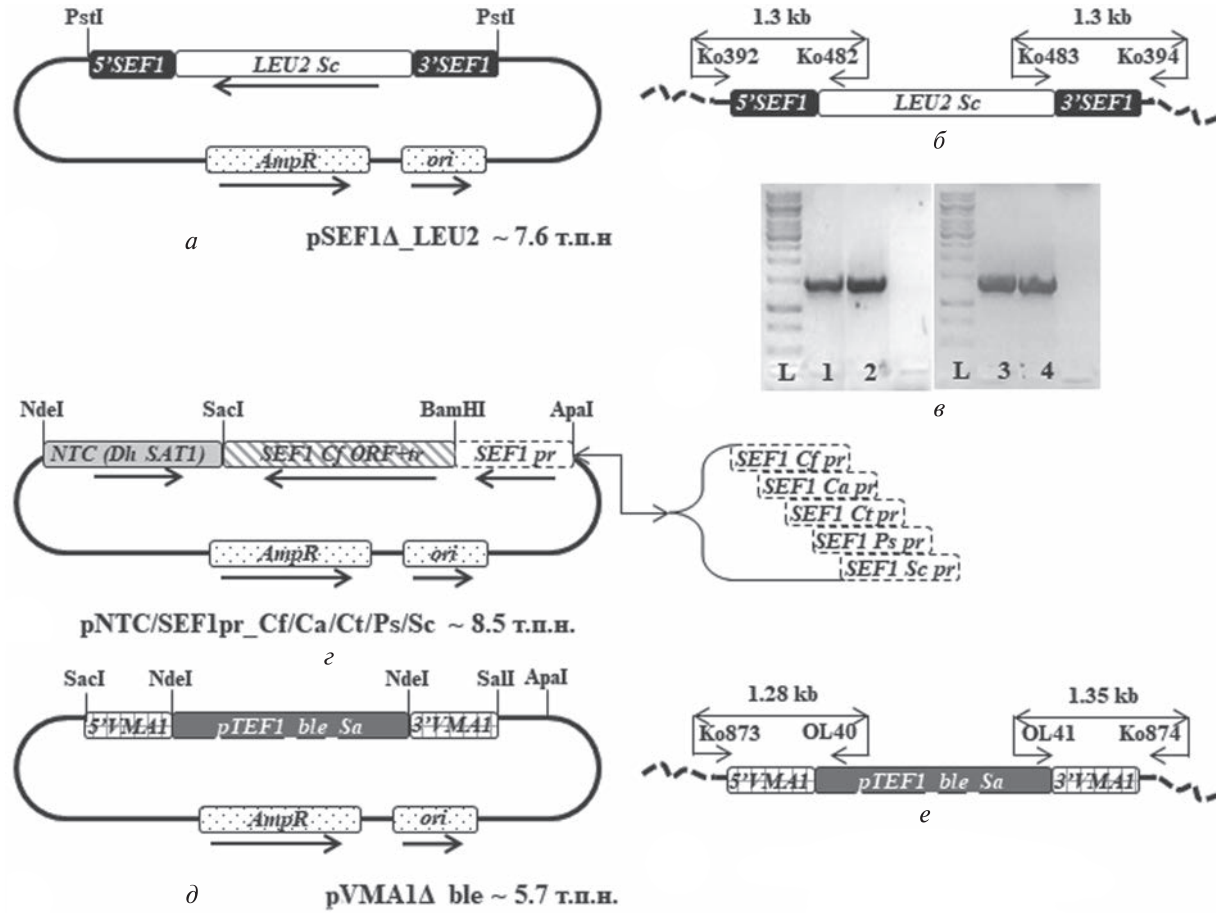
Таблиця 1. **Послідовності праймерів, використаних у роботі**

Назва праймера	Послідовність праймера 5′-3′
OL20	CGGGATCCATGGAGAAGTCTAGAATAAAATCAATACTT
OL23	AGGTTGAAGTGGGAATTGCATC
OL35	CCCGAGCTCTCAATACGACTTCACTCCTGG
OL36	CAGATTTTGAGTCTGTAAAGCCATATGGAAATAGTGCTTGCAAATTCC
OL37	GGAATTTGCAAGCACTATTTCCATATGGCTTTACAGACTCAAAATCTG
OL38	CCCC GTCGAC AAAATGAAGCTAACTTGGCACCTA
OL40	CCCTATTTACTGTTACCATCC
OL41	GTTGCCGCATTGAAGTAGA
OL86	AAAGCGGCCGCATATGAGTCTTATATATATC
OL87	AAGCGGCCGCATATGTCACATAACCACAAG
OL143	AAAGAGCTCGAGCGTAATAATTGTCTACTGAACATC
OL144	AAAGGGCCCTTGTAGATTCTATCATGTCGCTTTACAGAAC
OL145	AAAGGATCCTTGAAAGATAACTTTTGCAACTAACTTTCCTATC
OL146	AAAGGGCCCAAACTAAAATTAGTGACTCATTTACTTGTTTTTG
OL147	AAAGGATCCTTTTCTATAGAAACAAATGTTGAGGTTCTATG
OL148	AAAGGGCCCAGAAACCAATTGGTGGGAATATTATTG
OL149	AAAGGATCCTTGGTCAATAGTTAGGATGTACAAATAAAAC
OL152	AAGGGCCCATGGAAATAAAATTATAAAAGCGACTTCG
OL153	AAAGGATCCGTTGTAACAGTGTGGAAGTGGAG
OL154	AAAGGGCCCATGGACCCTTCCTAAGCAGGC
OL155	AAAGGATCCGACGAGAATGCGTATACGCAGAG
Ko392	CGCGAGCTCATGGAGAAGTCAAGAATAAAATC
Ko394	CGCGGATCCTTAGTTTTCAGGAATCATGTTTG
Ko478	AAACTGCAGGTTCAACAAATGGAGGAAACAAG
Ko479	AAACTGCAGTGCGTTCTCCAATAAATAATCCG
Ko480	CGCGTCGACCTTACCTACAAATTTCCGTTGTC
Ko481	CGCGGATCCTCGAACCAACCTAAGAAATCATC
Ko482	TGATGTAATTGTTGGGATTCC
Ko483	CAATACCTTCTTGAACCATTTC
Ko873	GGTATTGATGCCCCAGCATTATC
Ko874	CAGGATCAGAGAAATCACCACC

tems, Foster City, CA, USA). Трансформацію *C. famata* проводили методом електропорації як описано раніше [14].

Конструювання плазмід. Для інактивації гена *SEF1* створено делеційну касету. Касету було сконструйовано на основі плазміди p19L2 [14]. ДНК-фрагмент, що містив 5′-частину гена *SEF1 C. famata*, було ПЛР-ампліфіковано, використовуючи пару праймерів Ko478/Ko479 (послідовності усіх праймерів вказані у табл. 1) та хромосомну ДНК штама *C. famata* L20105 як матрицю. Цей фрагмент було оброблено ендонуклеазою рестрикції PstI та клоновано у PstI-лінеаризовану плазміду p19L2. 3′-частину *SEF1* гена ампліфікували, використовуючи праймери Ko480/Ko481 та клонували у склад плазміди p19L2, що містить 5′-частину гена *SEF1*, використовуючи сайти рестрикції для ендонуклеаз SalI та BamHI. Сконструйована плазміда також містила ген *LEU2* як селективний маркер та отримала назву pSEF1Δ_LEU2 (рис. 1, *a*).

Для дослідження видо-специфічної регуляції транскрипції гена *SEF1*, було сконструйовано низку касет для експресії цього гена. Для цього ген *SAT1*, що забезпечує резистентність до норзеотрицину, було ампліфіковано з плазміди pG-SAT-1 [16] з використанням праймерів OL86/OL87. Отриманий фрагмент було оброблено ендонуклеазою NdeI та клоновано в NdeI-лінеаризовану плазміду pUC57. Відкриту рамку зчитування гена *SEF1 C. famata* із власним термінатором було ампліфіковано з геномної



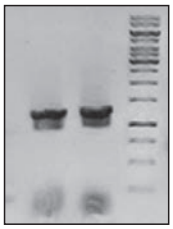

є

Рис. 1. Кільцева схема плазміди pSEF1Δ_LEU2. Ген *LEU2 S. cerevisiae* позначено білим прямокутником, 5′ та 3′ частини гена *SEF1* позначені чорним прямокутником (*а*). Схема делеційної касети гена *SEF1* інтегрованої у геном *C. famata*, праймери для ПЛР підтвердження коректної інтеграції касети вказані стрілками (*б*). Електрофореграма ПЛР-продуктів з використанням пар праймерів Ko392/Ko482 (1,2) та Ko483/Ko394 (3,4) з геномною ДНК штама *sef1Δ* у якості матриці, що підтверджує коректність делеції гена *SEF1*; L − 1 т.п.н. маркер молекулярної ваги (*в*). Кільцева схема плазміди pNTC/SEF1pr_Cf/Ca/Ct/Ps/Sc. *NTC* − ген, що забезпечує резистентність до норзеотрицину, позначено світло-сірим прямокутником, ВРЗ гена *SEF1 C. famata* під контролем промоторів (SEF1 pr) з різних дріжджів позначені довгим посмугованим прямокутником та прямокутником із пунктирним контуром, відповідно (*г*). Кільцева схема плазміди pVMA1Δ_ble, ген *ble* під контролем промотора гена *TEF1* з *C. famata*, що забезпечує резистентність до флеоміцину (позначено темно-сірим прямокутником, 5′ та 3′ частини гена *VMA1* позначені прямокутниками у клітинку (*д*). Схема делеційної касети гена *VMA1* інтегрованої у геном *C. famata*, праймери для ПЛР підтвердження коректної інтеграції касети вказані стрілками (*е*). Електрофореграма ПЛР-продуктів з використанням пар праймерів Ko873/OL40 (1) та OL41/Ko874 (2) з геномною ДНК штаму *vma1Δ* у якості матриці, що підтверджує коректність делеції гена *VMA1*; L − 1 kb маркер молекулярної ваги (*є*)

ДНК *C. famata* VKMY-9 за допомогою пари праймерів OL20/OL143. Ампліфікований фрагмент було оброблено ендонуклеазами рестрикції BamHI/SacI та клоновано до відповідних сайтів плазміди. Промотори гена *SEF1* ампліфіковано з геномної ДНК *C. famata*, використовуючи праймери OL144/OL145, *C. albicans* (OL146/OL147), *C. tropicalis* (OL148/OL149), *P. stipitis* (OL152/OL153), *S. cerevisiae* (OL154/OL155). Кожен із промоторів було клоновано

перед *SEF1* геном C. *famata* у сайти ApaI та BamHI. У результаті, рекомбінантні плазміди отримали назви pNTC/SEF1pr_Cf, pNTC/SEF1pr_Ca, pNTC/SEF1pr_Ct, pNTC/SEF1pr_Ps та pNTC/SEF1pr_Sc (рис. 1, *г*).

Наявність цільових конструкцій у геномі отриманих трансформантів підтверджували за допомогою ПЛР з використанням праймерів OL23/OL144 для визначення промотора з *C. famata*, OL23/OL146, OL23/OL148, OL23/OL152, OL23/OL154 для *C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. stipitis* і *S. cerevisiae*, відповідно.

Для конструювання касети для делеції гена *VMA1*, 5′-частину гена *VMA1* ампліфікували за допомогою ПЛР із геномної ДНК *C. famata,* використовуючи праймери OL35/OL36, тоді як 3′-частину – за допомогою праймерів OL37/OL38. 5′- та 3′-некодуючі ділянки гена *VMA1* було об'єднано за допомогою ПЛР, що перекривається. Отриманий фрагмент клонували у сайти SacI та SalI плазміди pBluescript II KS (⁻). Ген *ble Staphylococcus aureus* під контролем промотора гена *TEF1*, що забезпечує резистентність до флеоміцину, вищеплено з плазміди pTb [17] за допомогою ендонуклеаз EcoRI/KpnI та клоновано до складу попередньо сконструйованої плазміди, лінеаризованої рестриктазою NdeI. Затуплення липких кінців перед лігуванням проводили за допомогою T4 ДНК-полімерази. Сконструйована плазміда отримала назву pVMA1Δ_ble (рис. 1, *д*).

Біохімічний аналіз. Біомасу дріжджів визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Helios гамма (λ = 546 нм, кювета 1 см), розраховуючи суху вагу за калібруваль-ною кривою. Концентрацію рибофлавіну в зразках визначали за допомогою флуоримет-ра Turner Quantech Digital Filter Fluorometer FM109510-33, використовуючи фільтри збудження NB440 та емісії SC535 згідно з інструкціями виробника.

Результати. Для вивчення ролі гена *SEF1* у надсинтезі рибофлавіну було сконструйовано штам *C. famata* з делецією цього гена. Для цього штам дикого типу L20105 було протрансформовано делеційною касетою, лінеаризованою ендонуклеазою рестрикції SalI, використовуючи метод електропорації. Селекцію трансформантів проводили на агаризованому мінеральному середовищі без додавання лейцину. Відібрані штами були проаналізовані на здатність до синтезу рибофлавіну за умов дефіциту заліза. Штами підрощували на мінеральному середовищі, яке містило 1 мМ 3-(2-піридил)-5,6-дифеніл-1,2,4-триазин-4′,4″-дисульфат (Ферозин), що є хелатуючим агентом, здатним до зв'язування іонів заліза. Штами, нездатні до надсинтезу рибофлавіну за умов дефіциту заліза, були відібрані для подальшого аналізу. Коректність заміщення гена *SEF1* селективним маркером *LEU2* було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням прай-

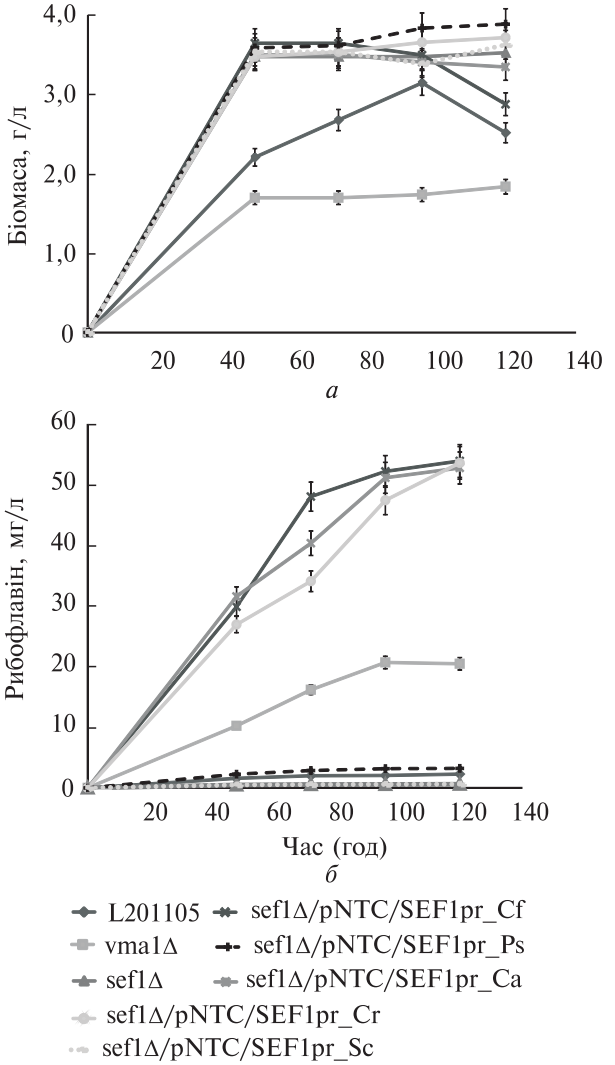


Рис. 2. Кінетика накопичення біомаси (*а*) та синтезу рибофлавіну (*б*) рекомбінантними штамами та штамом дикого типу L20105 на мінеральному середовищі YNB із додаванням лейцину в колбах

мерів, гомологічних ділянкам ДНК, поза межами 5′- та 3′-кодуючих фрагментів гена *SEF1* та праймерів, комплементарних послідовності гена *LEU2* (Ko392/Ko482 та Ko394/Ko483) (рис. 1, *б*, *в*). Штам *sef1*Δ втратив здатність до надсинтезу рибофлавіну за умов дефіциту заліза в середовищі, подібно до інсерційного штаму з пошкодженим геном *SEF1* [17].

Для аналізу впливу промоторів гена *SEF1* з різних флавіногенних та нефлавіногенних видів дріжджів на експресію *SEF1*, штам *sef1*Δ трансформували плазмідами pNTC/SEF1pr_Cf, pNTC/SEF1pr_Ca, pNTC/SEF1pr_Ct, pNTC/SEF1pr_Ps, pNTC/SEF1pr_Sc. Селекцію трансформантів проводили на багатому середовищі YPD із додаванням норзеотрицину. Трансформанти стабілізували шляхом культивування в неселективному середовищі упродовж 15–17 генерацій з наступним перенесенням на селективне середовище з норзеотрицином. Наявність цільових плазмід в геномі трансформантів було підтверджено за допомогою ПЛР (дані не наведено). Промотори гена *SEF1* флавіногенних дріжджів *C. albicans* і *C. tropicalis*, поєднані із ВРЗ *SEF1* гена *C. famata* відновлювали надсинтез рибофлавіну у *sef1*Δ (рис. 2, *б*).

Для делеції гена *VMA1*, *C. famata* L20105 було протрансформовано AhdI-лінеаризованою плазмідою pVMA1Δ_ble. Трансформанти культивували на багатому середовищі YPD із додаванням антибіотика флеоміцину. Серед 46 проаналізованих трансформантів було відібрано один з делецією гена *VMA1*. Делецію цільового гена було підтверджено за допомогою ПЛР, використовуючи праймери, гомологічні ділянкам ДНК, поза межами 5′- та 3′-некодуючих фрагментів гена *VMA1* та праймерів, комплементарних послідовності гена *ble* (OL41/Ko874 та OL40/Ko873) (рис. 1, *е*, *є*). Штам *vma1*Δ накопичував у 1,4 раза менше біомаси, при порівнянні з вихідним штамом L20105 (рис. 2. *а*, табл. 2). Продукція рибофлавіну мутантом *vma1*Δ сягала 20,5 мг/л, що у 9 разів перевищує продукцію рибофлавіну штамом дикого типу L20105 (рис. 2, *б*, табл. 2). Вихід рибофлавіну (у перерахунку кількості синтезованого рибофлавіну на грам сухої маси клітин) був у 12 разів вищим у делеційного штаму, порівняно із батьківським (табл. 2).

Обговорення. За допомогою методів класичної генетики було селекціоновано штами *C. famata*, які упродовж багатьох років успішно використовувалися для промислової продукції рибофлавіну [1]. Однак основним недоліком отриманого штаму-суперпродуцента dep8 є його генетична нестабільність. З високою частотою з'являються нефлавіногенні ревертанти, що знижують вихід цільового продукту.

Завдяки сучасним методам метаболічної інженерії та розумінню регуляторних процесів синтезу рибофлавіну можна отримати конкурентні продуценти вітаміну B_2 на основі цього виду дріжджів. У нашій попередній роботі за допомогою методів класичної селекції було отримано стабільний продуцент рибофлавіну AF-4 [9]. Пізніше цей штам було вдосконалено за допомогою підходів метаболічної інженерії шляхом надекспресії структурних генів синтезу рибофлавіну *RIB1*, *RIB7* та регуляторного гена *SEF1* [9, 10]. Для подальшого

Таблиця 2. **Біомаса клітин, синтез рибофлавіну та вихід рибофлавіну у рекомбінантних штамів *C. famata* та штаму дикого типу L20105 на п'ятий день культивування на мінеральному середовищі YNB із додаванням лейцину**

Штам	Біомаса, г/л	Рибофлавін, мг/л	Вихід рибофлавіну, мг/г
sef1Δ/pNTC/SEF1pr_Cf	2,88 ± 0,18	54,00 ± 1,95	18,75 ± 0,61
sef1Δ/pNTC/SEF1pr_Ca	3,35 ± 0,19	52,85 ± 2,11	15,78 ± 0,71
sef1Δ/pNTC/SEF1pr_Ct	3,72 ± 0,18	53,69 ± 1,55	14,43 ± 0,39
sef1Δ/pNTC/SEF1pr_Ps	3,89 ± 0,20	3,23 ± 0,04	0,83 ± 0,01
sef1Δ/pNTC/SEF1pr_Sc	3,63 ± 0,21	0,62 ± 0,03	0,17 ± 0,01
sef1Δ	3,53 ± 0,15	0,60 ± 0,05	0,17 ± 0,02
vma1Δ	1,84 ± 0,06	20,50 ± 0,95	11,14 ± 0,81
L20105	2,52 ± 0,17	2,28 ± 0,07	0,90 ± 0,02

поліпшення продукції рибофлавіну було підвищено постачання пуриновим попередником біосинтезу рибофлавіну. За допомогою сайт-специфічного мутагенезу було усунено ретроінгібування фосфорибозилпірофосфатсинтетази (ФРПС) і фосфорибозилпірофосфатамідотрансферази (ФРПАТ), які відповідно каталізують утворення фосфорибозилпірофосфату і фосфорибозиламіну (початкових компонентів біосинтезу пуринів *de novo*) та посилено експресію відповідних модифікованих генів, що кодують ФРПС і ФРПАТ. Сконструйовані штами характеризувалися зростанням продукції рибофлавіну, що сягало 2,85 г/л при культивуванні в колбах [18]. Транскрипційний фактор Sef1 є позитивним регулятором біосинтезу рибофлавіну та відіграє важливу роль у метаболізмі іонів заліза у флавіногенних дріжджів *C. famata* та *C. albicans* [1]. Однак механізми регуляції синтезу рибофлавіну за участі Sef1 до кінця не з'ясовано. У даній роботі встановлено, що експресія гена *SEF1 C. famata* під контролем гетерологічних промоторів *SEF1* із флавіногенних дріжджів *C. albicans* та *C. tropicalis* відновлюють надсинтез рибофлавіну у мутанта *sef1*Δ, тоді як промотори гена *SEF1* з нефлавіногенних дріжджів *P. stipitis* та *S. cerevisiae* до відновлення надсинтезу вітаміну B_2 нездатні. Цікаво відзначити, що серед *C. tropicalis* є штами здатні до надпродукції вітаміну B_2 а також такі, що не виявляють здатності до надсинтезу рибофлавіну [19]. Отримані результати вказують на спільні механізми регуляції експресії *SEF1* у різних видів флавіногенних дріжджів.

Пошкодження гена *VMA1*, що кодує вакуолярну АТФазу, яка забезпечує активний транспорт рибофлавіну з цитоплазми у вакуолі, приводило до повної екскреції синтезованого рибофлавіну в середовище, підвищуючи загальну продукцію цього вітаміну міцеліальним грибом *A. gossypii* [20]. Втім, рибофлавін не нагромаджується у значних кількостях у вакуолях *C. famata*. Тому механізм зростання продукції вітаміну B_2 у *vma1Δ C. famata* поки що залишається нез'ясованим. Однак цей феномен може бути використаний для конструювання більш ефективних продуцентів рибофлавіну.

Висновки. Гетерологічні промотори *SEF1* флавіногенних дріжджів *C. albicans* та *C. tropicalis* відновлюють надсинтез рибофлавіну у мутанта *sef1*Δ, тоді як промотори гена *SEF1* нефлавіногенних дріжджів *P. stipitis* та *S. cerevisiae* до відновлення надсинтезу вітаміну B_2 нездатні. Делеція гена *VMA1 C. famata* підвищує продукцію рибофлавіну за умов нормального збагачення середовища іонами заліза.

Дотримання етичних стандартів. Ця робота виконана з дотриманням етичних вимог кожним із авторів та не передбачає досліджень, у які залучено тварин або людей.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу виконано за часткової фінансової підтримки польського гранту Національного наукового центру (NCN) Opus UMO-2018/29/B/NZ1/01-497 та Національної академії наук України (грант 36–19).

SEF1 AND *VMA1* GENES REGULATE RIBOFLAVIN BIOSYNTHESIS IN THE FLAVINOGENIC YEAST *CANDIDA FAMATA*

Y. Andreieva, O. Lyzak, Wen Liu, Yingqian Kang, K. Dmytruk, A. Sibirny

Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine, Drahomanov St, 14/16, Lviv, 79005, Ukraine
Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany
Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025 China
University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland

E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

Riboflavin (vitamin B_2) is an important component of the diet of living organisms due to its serving as a precursor of flavin coenzymes FMN (flavin mononucleotide) and FAD (flavin adenine dinucleotide) involved in numerous enzymatic reactions. It is known that flavinogenic yeast *C. famata* is able of riboflavin oversynthesis under condition of iron starvation, but the regulation of this process remains unknown. It was shown that the deletion of *SEF1* gene (encoding transcription activator) blocked the ability of riboflavin oversynthesis under iron-limiting conditions. It was determined that SEF1 promoters of other flavinogenic yeasts (*Candida albicans* and *Candida tropicalis*), fused with *SEF1* ORF of *C. famata* can restore the oversynthesis of riboflavin in *sef1Δ* mutant. The disruption of *VMA1* gene (coding for vacuolar ATPase subunit A) led to oversynthesis of riboflavin in *C. famata* in iron complete medium.

ГЕНЫ SEF1 И VMA1 РЕГУЛИРУЮТ БИОСИНТЕЗ РИБОФЛАВИНА ФЛАВИНОГЕННЫМИ ДРОЖЖАМИ *CANDIDA FAMATA*

Ю.А. Андреева, О.О. Лизак, Вен Лю, Иньцян Кан, К.В. Дмитрук, А.А. Сибирный

Рибофлавин (витамин B_2) – важный компонент питания живых организмов, поскольку служит прекурсором флавиновых коферментов ФМН (флавинмононуклеотид) и ФАД (флавинадениндинуклеотид), которые, в свою очередь, участвуют в множестве важных ферментативных реакций. Известно, что в условиях дефицита железа в среде, флавиногенные дрожжи *Candida famata* сверхпродуцируют рибофлавин, однако до сих пор регуляция этого процесса не исследована. Установлено, что делеция гена *SEF1*, кодирующего транскрипционный активатор, блокирует способность дрожжей к сверхпродукции рибофлавина в условиях дефицита железа. Показано, что промоторы гена *SEF1* других флавиногенних дрожжей (*Candida albicans* и *Candida tropicalis*), объединенные с ОРС *SEF1* гена *C. famata* способны восстанавливать сверхсинтез рибофлавина у мутанта *sef1Δ*. Установлено, что повреждение гена *VMA1* (кодирует субъединицу А вакуолярной АТФазы) ведет к сверхсинтезу рибофлавина у *C. famata* в условиях нормального обогащения среды железом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abbas, C.A., Sibirny, A.A., Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2011, vol. 75, no. 2, pp. 321–360. doi: 10.1128/MMBR.00030-10.
2. Lim, S.H., Choi, J.S. and Park, E.Y., Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: an overview, *Biotechnol. Bioproc. Engineer.*, 2001, vol. 6, pp. 75–88. doi: 10.1007/bf02931951.
3. Stahmann, K.-P., Revuelta, J.L., and Seulberger, H., Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, vol. 53, pp. 509–16. doi: 10.1007/s002530051649.
4. Vandamme, E.J., Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1992, vol. 53, pp. 313–27. doi: 10.1002/jctb.280530402.
5. Kato, T., Park, E.Y., Riboflavin production by *Ashbya gossypii*, *Biotechnol. Letters*, 2012, vol. 34, pp. 611–8. doi: 10.1007/s10529-011-0833-z.
6. Schwechheimer, S.K., Park, E.Y., Revuelta, J.L., Becker, J., and Wittmann, C., Biotechnology of riboflavin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol. 100, no. 5, pp. 2107–19. doi: 10.1007/s00253-015-7256-z.
7. Burgess, C.M., Smid, E.J. and van Sinderen, D., Bacterial vitamin B_2, B_{11} and B_{12} overproduction: an overview, *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, vol. 133, no. 1–2, pp.1–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.012.
8. Chen, C., Noble, S.M., Post-transcriptional regulation of the Sef1 transcription factor controls the virulence of *Candida albicans* in its mammalian host, *PLoS Pathog.*, 2012, vol. 8, no. 11, e1002956. doi: 10.1371/journal.ppat.1002956.
9. Dmytruk, K.V., Yatsyshyn, V.Y., Sybirna, N.O., Fedorovych, D.V., and Sibirny, A.A., Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida* flareri) for construction of strains with enhanced riboflavin production, *Metabol. Engin.*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 82–8. doi: 10.1016/j.ymben.2010.10.005.
10. Dmytruk, K., Lyzak, O., Yatsyshyn, V., Kluz, M., Sibirny, V., Puchalski, C., and Sibirny, A., Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production, *J. Biotechnol.*, 2014, vol. 172, pp. 11–7. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.12.005.
11. Voronovsky, A.Y., Abbas, C.A., Dmytruk, K.V., Ishchuk, O.P., Kshanovska, B.V., Sybirna, K.A., Gaillardin, C., and Sibirny, A.A., *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) DNA sequences containing genes involved in riboflavin synthesis, *Yeast*, 2004, vol. 21, pp. 1307–16. doi: 10.1002/yea.1182.
12. Boretsky, Y.R., Pynyaha, Y.V., Boretsky, V.Y., Fedorovych, D.V., Fayura, L.R., Protchenko, O., Philpott, C.C., and Sibirny, A.A., Identification of the genes affecting the regulation of riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii* using insertion mutagenesis, *FEMS Yeast Res.*, 2011, vol. 11, no. 3, pp. 307–14. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00720.x.
13. Forster, C., Santos, M. A., Ruffert, S., Kramer, R., and Revuelta, J.L., Physiological consequence of disruption of the *VMA1* gene in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*, *J. Biol. Chem.,* 1999, vol. 274, pp. 9442–8. doi: 10.1074/jbc.274.14.9442.
14. Voronovsky, A.A., Abbas, C.A., Fayura, L.R., Kshanovska, B.V., Dmytruk, K.V., Sybirna, K.A., and Sibirny, A.A., Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata*, *FEMS Yeast Res.*, 2002, vol. 2, pp. 381–8. doi: 10.1016/S1567-1356(02)00112-5.
15. Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual second ed.,* NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989.

16. Millerioux, Y., Clastre, M., Simkin, A.J., Courdavault, V., Marais, E., Sibirny, A.A., Nолl, T., Сгиche, J., Giglioli-Guivarc'h, N., and Papon, N., Drug-resistant cassettes for the efficient transformation of *Candida guilliermondii* wild-type strains, *FEMS Yeast Res.*, 2001, vol. 11, no. 6, pp. 457–63. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00731.x.
17. Dmytruk, K.V., Voronovsky, A.Y., and Sibirny, A.A., Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments, *Curr. Genet.,* 2006, vol. 50, pp. 183–91. doi: 10.1007/s00294-006-0083-0.
18. Dmytruk, K.V., Ruchala, J., Fedorovych, D.V., Ostapiv, R.D., and Sibirny, A.A., Modulation of the Purine Pathway for Riboflavin Production in Flavinogenic Recombinant Strain of the Yeast *Cand. Famata, Biotechnol. J.*, 2020, vol. 22. doi: 10.1002/biot.201900468.
19. Patcharanan, A., Riboflavin production by *Candida tropicalis* isolated from seawater, *Sci. Res. Essays*, 2013, vol. 8, no. 1, pp. 43–7. doi: 10.5897/SRE12.603.
20. Mateos, L., Jimenez, A., and Revuelta, J.L., Purine biosynthesis, riboflavin production, and trophic–phase span are controlled by a Myb–related transcription factor in the fungus *Ashbya gossypii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, pp. 5052–60. doi: 10.1128/AEM.00424-06.

Надійшла в редакцію 10.03.20
Після доопрацювання 25.03.20
Прийнята до друку 18.09.20