

ВПЛИВ ГЕНА *SFU1* НА СИНТЕЗ РИБОФЛАВІНУ У ФЛАВІНОГЕННИХ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA*

Я.О. ПЕТРОВСЬКА¹, О.О. ЛИЗАК², К.В. ДМИТРУК¹, А.А. СИБІРНИЙ^{1,3,*}

¹ Інститут біології клітини Національної академії наук України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

² Інститут біохімії імені Макса Планка, Ам Клопфершгіц 18, 82152 Мартінсрід, Німеччина

³ Жешувський Університет, вул. Зельверовича, 4, 35-601 Жешув, Польща;

E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

Рибофлавін або вітамін В₂ є невід'ємним компонентом всіх живих організмів, слугуючи попередником флавінових коферментів ФМН (флавінмононуклеотид) та ФАД (флавінаденіндинуклеотид), що беруть участь у численних ферментативних реакціях. Флавіногенні дріжджі Candida famata надпродукують рибофлавін за умов дефіциту заліза в середовищі, однак регуляція цього процесу досліджена недостатньо. Попередньо ідентифіковано регуляторний ген SEF1, що кодує транскрипційний активатор. Його делеція блокує здатність дріжджів до надсинтезу рибофлавіну за умов дефіциту заліза. Також відомо, що у патогенних флавіногенних дріжджів Candida albicans, Sfu1 (транскрипційний фактор GATA-типу) пригнічує експресію гена SEF1. В даній роботі було встановлено, що делеція гена SFU1 C. famata підвищує продукцію рибофлавіну.

Ключові слова: рибофлавін, *Candida famata*, *SFU1*, дріжджі.

Вступ. Рибофлавін є важливим компонентом будь-якого живого організму, оскільки слугує метаболічним попередником флавінових нуклеотидів ФМН та ФАД, котрі виконують роль коензимів в численних ферментативних реакціях, найчастіше реакції оксидативного метаболізму. На відміну від рослин, грибів та більшості прокариот, тварини не здатні синтезувати рибофлавін [1, 2]. Важливою передумовою нормального росту тварин та птахів є достатня збагаченість кормів вітаміном В₂. Дефіцит РФ у кормових раціонах веде до порушення обміну речовин, затримки росту, погіршення засвоєння амінокислот і жирів, послаблення зору, дерматозів, зниження продуктивності і використання поживних речовин у кормах. Введення РФ у склад преміксів, комбікормів і кормосумішей для тварин і птиці підвищує їх приріст, покращує виживання молодняка, збільшує про-

дуктивність, знижує затрати кормів на одиницю продукції [3]. Зважаючи на це, розвиток продукції рибофлавіну на промисловому рівні є надзвичайно важливим. Рибофлавін може бути отримано шляхом як хімічного, так і мікробного синтезу. До переваг мікробного синтезу належать зменшення кількості відходів, нижчі енергетичні витрати, та використання поновлюваних ресурсів, наприклад цукрів та рослинних олій [2, 4, 5]. На 2012 рік, загальна світова продукція рибофлавіну складала близько 9000 т, більша частина яких була вироблена BASF, DSM та Hubei Guangji Pharmaceutical. Близько 70 % цієї сировини використовується в сільському господарстві як кормові добавки, в той час як інші 30 % використовуються у харчовій промисловості та в клінічних цілях.

Світовий ринок рибофлавіну оцінюється в межах від 200 до 230 мільйонів доларів на рік, залежно від ціни на рибофлавін, яка сильно коливається в залежності від попиту на ринку [6]. За минулі два десятиліття, мікробна продукція рибофлавіну шляхом ферментації повністю замінила хімічний синтез [7]. На даний час, промислове виробництво рибофлавіну досягається шляхом використання рекомбінантного штаму грам-позитивної бактерії *Bacillus subtilis* та цвільового гриба *Ashbya gossypii* [2, 8]. Флавіногенні дріжджі *C. famata* також належать до найбільш активних продуцентів рибофлавіну з виходом близько 21 г/л цього вітаміну [1, 4]. Не зважаючи на це, промислова продукція рибофлавіну мутантними штамми *C. famata* була зупинена декілька років тому через низьку генетичну стабільність промислових продуцентів [1]. Тим не менш, дріжджі мають ряд технологічних переваг над грибами та бактеріями. Перевагою у виробництві РФ з використанням дріжджів є здатність цих мікроорганізмів рости на простих живильних сере-

© Я.О. ПЕТРОВСЬКА, О.О. ЛИЗАК, К.В. ДМИТРУК,
А.А. СИБІРНИЙ, 2020

довищах, напівпродуктах та відходах харчової промисловості. Крім того, дріжджова біомаса є цінним джерелом збалансованого за амінокислотним складом кормового білка [9]. Впродовж минулого десятиліття, за допомогою комбінації методів класичної селекції та метаболічної інженерії, було створено стабільний надпродуцент рибофлавіну *S. famata* [9–11]. Тим не менш, він поступається промисловим продуцентам *B. subtilis* та *A. gossypii*. Подальші вдосконалення стабільного продуцента *S. famata* суттєво залежать від з'ясування механізмів регуляції синтезу рибофлавіну.

На жаль, регуляторні механізми синтезу рибофлавіну в дріжджах та грибах досліджені недостатньо. Транскрипційний активатор Sef1 *S. famata* є позитивним регулятором синтезу рибофлавіну [12]. Він відіграє центральну роль в гомеостазі заліза, патогенності та регуляції синтезу рибофлавіну в *S. albicans*. Також було показано, що в патогенних флавіногенних дріжджів *S. albicans*, транскрипційний фактор Sfu1 (родини GATA) відіграє роль в зменшенні токсичності клітин в середовищі, багатому на залізо. Sfu1 пригнічує активність Sef1, та опосередковано Нар43, призводячи таким чином до репресії генів, задіяних в гомеостазі заліза [13]. Пригнічення активності Sef1 транскрипційним фактором Sfu1 відбувається шляхом фізичного зв'язування Sfu1 із Sef1 та виведення його в цитоплазму, де він не здатний здійснювати транскрипційну активацію генів транспорту заліза [14].

В цій роботі ми описуємо конструювання штаму *S. famata sfu1Δ*, що характеризується під-

вищенням продукції рибофлавіну порівняно з вихідним штамом.

Матеріали та методи. *Штами, середовища, умови культивування.* У цій роботі використовувалися штами *S. famata* VKMY-9 (Всеросійська Колекція Мікроорганізмів, Пушино, Росія) та L20105 (*leu2*) [15]. Дріжджі вирощували при температурі 30 °C на багатому (YPD) середовищі, що містить пептон (1 %), дріжджовий екстракт (0,5 %) та глюкозу (2 %), чи мінеральному (YNB) середовищі, що містить YNB (yeast nitrogen base) (1,7 г/л), амоній сульфат (0,5 %), глюкозу (2 %). Амінокислоти та нуклеотиди додавались до YNB до кінцевої концентрації 40 мг/л. Для селекції дріжджових трансформантів, до середовища YPD додавали антибіотики норзеотрицин (4 мг/л) та флеоміцин (3 мг/л).

Штам *Escherichia coli* DH5α [Ф80d*lacZ*ΔM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_{K}^{-} m_{K}^{+}), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)U169] було використано для конструювання плазмід. DH5α культивувався при температурі 37 °C в багатому (LB) середовищі [16]. Трансформанти *E. coli* вирощували в поживному середовищі з ампіциліном у концентрації 100 мг/л.

Молекулярно-генетичні методи. Були використані стандартні методики клонування [16]. Геномна ДНК *S. famata* була ізольована з використанням Wizards Genomic DNA Purification Kit (Promega, Медісон, Вісконсин, США). Ендонуклеази рестрикції та ДНК-лігази (Fermentas, Вільнюс, Литва) використовувались згідно інструкцій виробника. Виділення плазмідної ДНК *E. coli* проводилось за допомогою Wizards

Таблиця 1. Послідовності використаних у роботі праймерів

Назва праймера	5'-3' послідовність праймера
OL40	CCCTATTACTGTTACCATCC
OL76	AAGGATCCCTCCATCTAATCTATCC
OL79	AAGGATCCCTATAATATTATATACAAAACGTC
OL80	GGGCGCTGATAATTCATACTAG
OL81	CTTAGAGAACTGTCTATATCTGACAT
OL82	GATGCTGATGCTGATGAGGCGGCCGCTCACTCGATTCTTCCC
OL83	GGGAAGAATCGAGTGACGCGGCCGCTCATCAGCATCAGCATC
OL84	CCGCGGCCGCTAACGAACAGCTCATC
OL85	CCGCGGCCGCAATCTCCACSTTTAAAC
Ко974	TTTCGGTAAGCTAGACAAAAC

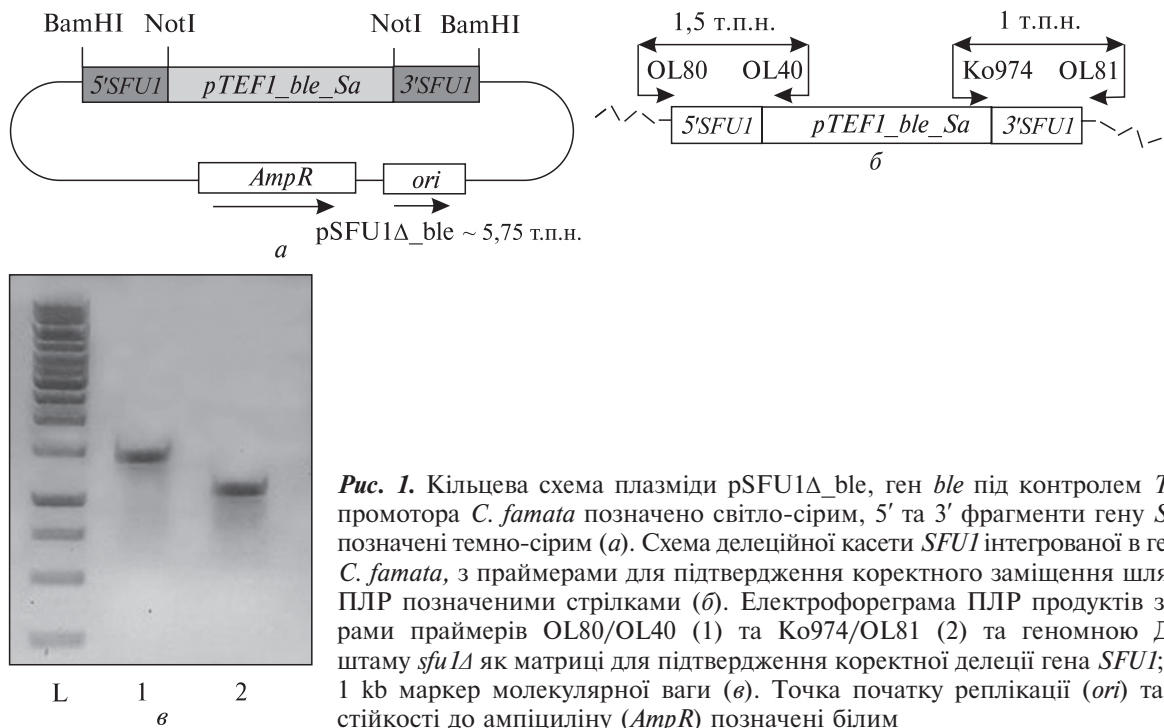


Рис. 1. Кільцева схема плазмиди pSFU1 Δ _ble, ген *ble* під контролем *TEF1* промотора *C. famata* позначено світло-сірим, 5' та 3' фрагменти гену *SFU1* позначені темно-сірим (а). Схема делеційної касети *SFU1* інтегрованої в геном *C. famata*, з праймерами для підтвердження коректного заміщення шляхом ПЛР позначеними стрілками (б). Електрофореграма ПЛР продуктів з парами праймерів OL80/OL40 (1) та Ko974/OL81 (2) та геномною ДНК штаму *sfu1 Δ* як матриці для підтвердження коректної делеції гену *SFU1*; L – 1 kb маркер молекулярної ваги (в). Точка початку реплікації (*ori*) та ген стійкості до ампіциліну (*AmpR*) позначені білим

Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Медисон, Вісконсин, США). При проведенні ПЛР-ампліфікації цільових фрагментів використовували Platinum Taq ДНК полімеазу (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія, США) відповідно до інструкцій виробника. ПЛР проводилось в GeneAmps PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Фостер-Сіті, Каліфорнія, США). Трансформацію *C. famata* проводили методом електропорації як описано раніше [15].

Конструювання плазмід. З метою конструювання касети, необхідної для делеції, ДНК-фрагмент, що містив 5'-частину гену *SFU1* було ампліфіковано полімеразною ланцюговою реакцією з геномною ДНК *C. famata* з використанням пари праймерів OL76/OL82 (послідовності всіх праймерів вказані в табл. 1). 3'-фрагмент *SFU1* було ампліфіковано, використовуючи пару праймерів OL83/OL79. Відповідні фрагменти було об'єднано за допомогою ПЛР, що перекривається, з використанням праймерів OL76/OL79. Отриманий фрагмент було клоновано в BamHI сайт pUC57. Селективний маркер, ген *ble* під контролем *TEF1* промотора *C. famata*, що забезпечує резистент-

ність до флеоміцину, було ізольовано з плазмиди pTb [12] за допомогою праймерів OL84/OL85 та клоновано в NotI сайт. Сконструйована плазмиди отримала назву pSFU1 Δ _ble (рис. 1, а).

Біохімічний аналіз. Дріжджову біомасу визначали спектрофотометрично з використанням спектрофотометра Helios Gamma (OD, 546 нм; кювета, 10 мм) з гравіметричним калібруванням, розраховуючи суху вагу за калібрувальною кривою. Концентрацію рибофлавіну в зразках визначали за допомогою флуориметра Turner Quantech Digital Filter Fluorometer FM109510-33, використовуючи фільтри збудження NB440 та емісії SC535 згідно з інструкціями виробника.

Результати. Для визначення ролі гену *SFU1* *C. famata* в синтезі рибофлавіну, штам *C. famata* L20105 було трансформовано делеційною касетою у складі плазмиди pSFU1 Δ _ble (рис. 1, а), лінеаризованою ендонуклеазою рестрикції AatII. Трансформанти культивували на середовищі YPD з флеоміцином. Попередньо було показано, що *sfu1 Δ* *C. albicans* є чутливим до підвищеної концентрації CuSO₄ [17]. Отже, для селекції *sfu1 Δ* *C. famata*, було проведено скринінг трансформантів на 10 mM CuSO₄ та відібрано штамми з пригніченим ростом. Серед них,

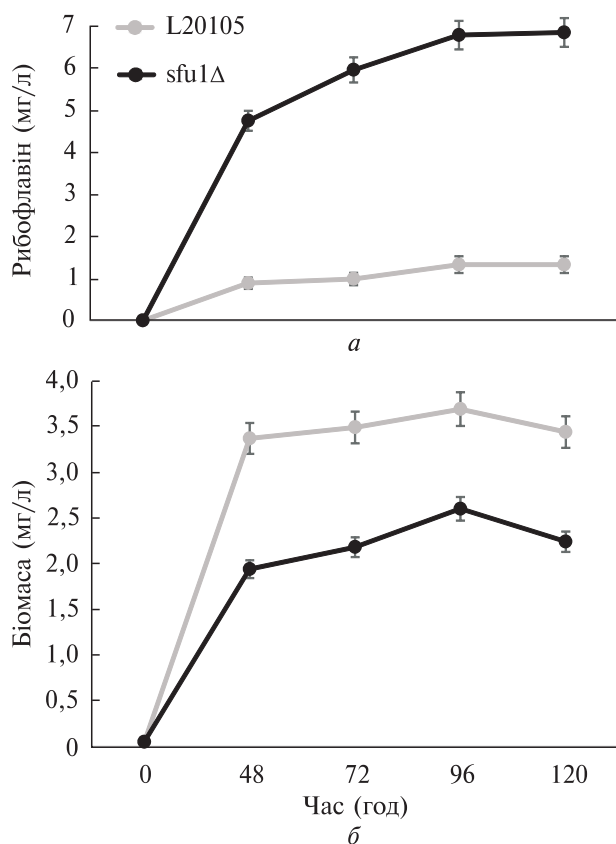


Рис. 2. Продукція рибофлавіну (а) та накопичення біомаси (б) штамми L20105 та *sfu1Δ* *C. famata* в колбах з мінімальним середовищем

шість мали делецію гена *SFUI*, підтверджену ПЛР аналізом, використовуючи пари праймерів OL40/OL80 та OL81/Ко974 з гомологією до селективних маркерів та послідовностей поза межами 5'- та 3'-фрагментів, використаних для рекомбінації (рис. 1, б, в). Штам *sfu1Δ* накопичував в 1,5 раза менше біомаси порівняно з батьківським штамом (рис. 2. б). Однак продукція рибофлавіну була в 5,1 раза вищою, при порівнянні з вихідним штамом (рис. 2, а). Штам *sfu1Δ* характеризувався зростанням виходу рибофлавіну в 6,7 раза у порівнянні з батьківським штамом, та становив 2,6 мг/г біомаси.

Обговорення. Дріжджі *C. famata* є перспективним продуцентом рибофлавіну, який попередньо вже використовувався в промисловості, що було зупинено через нестабільність штамів та відносно низький рівень синтезу рибофлавіну. Застосування методів метаболічної інже-

нерії дозволяє суттєво поліпшити продукцію рибофлавіну, підвищити стабільність та повернути *C. famata* у промислове виробництво вітаміну B_2 . Першим кроком у цьому напрямку була селекція стабільного продуцента рибофлавіну AF-4 за допомогою класичного мутагенезу [9]. На наступному етапі було поліпшено продукцію рибофлавіну шляхом підвищення експресії регуляторного гена *SEF1*, а також одночасної надекспресії структурних генів біосинтезу рибофлавіну *RIB1* (ГТФ-циклогідролаза II) та *RIB7* (рибофлавінсинтаза) [9, 11]. Транскрипційний фактор Sef1 відіграє центральну роль в регуляції синтезу рибофлавіну та гомеостазі заліза в *C. famata* і *C. albicans* [1]. Розуміння його функцій та регуляції дає можливість до підвищення продукції рибофлавіну. Виявлення ролі гена *SEF1* в надсинтезі рибофлавіну надає унікальну можливість модифікувати *C. famata*, міняючи генну регуляторну мережу в бік надсинтезу рибофлавіну. Цей спосіб значно більш гнучкий, і може бути розширеним модифікацією гену *SFUI*, який слугує ще одним елементом в залізо/рибофлавін регуляторній мережі флавіногенних дріжджів. Надсинтез рибофлавіну у *sfu1Δ*, найбільш вірогідно спричинений дерепресією Sef1. Можна висунути припущення, що одночасна модифікація цих генів матиме адитивний ефект на продукцію вітаміну B_2 .

Таким чином, отримані результати виявили нову перспективну мішень для метаболічної інженерії флавіногенних штамів *C. famata*, з метою покращення продукції вітаміну B_2 . Останні досягнення в генетичній інженерії дріжджів, наприклад адаптація CRISPR-Cas9 системи, перетворюють *C. famata* в привабливий організм для подальшого вдосконалення не лише продуцентів рибофлавіну, а й його похідних – ФМН, ФАД та розеофлавіну.

Висновки. Встановлено, що делеція гена *SFUI* *C. famata* підвищує продукцію рибофлавіну.

Дотримання етичних стандартів. Робота, описана в статті, була виконана з дотриманням етичних стандартів.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження було підтримане Польським Національним Науковим Центром, грантом Opus UMO-2018/29/B/NZ1/01-497 та

Національною академією наук України (Грант 36-19).

EFFECT OF GENE *SFU1* ON THE RIBOFLAVIN SYNTHESIS IN FLAVINOGENIC YEAST *CANDIDA FAMATA*

Y. Petrovska, O. Lyzak, 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
University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland
E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

Riboflavin or vitamin B₂ is a necessary component for all living organisms being the precursor of flavin coenzymes FMN (flavin mononucleotide) and FAD (flavin adenine dinucleotide) involved in numerous enzymatic reactions. Flavino-genic yeast *Candida famata* overproduces riboflavin under iron starvation; however, regulation of this process is poorly understood. Regulatory gene *SEF1* encoding transcription activator has been identified. Its deletion blocks yeast ability to overproduce riboflavin under iron starvation. It is known that in the pathogenic flavino-genic yeast *C. albicans*, Sfu1 (GATA-type transcription factor) represses *SEF1*. Here we found that deletion of *SFU1* gene in wild type *C. famata* leads to riboflavin oversynthesis.

ВЛИЯНИЕ ГЕНА *SFU1* НА СИНТЕЗ РИБОФЛАВИНА У ФЛАВИНОГЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA FAMATA*

Я.О. Петровская, О.О. Лызак, К.В. Дмитрук, А.А. Сибирный

Рибофлавин или витамин В₂ является обязательным компонентом всех живых организмов, являясь предшественником флавиновых коферментов ФМН (флавиномононуклеотид) и ФАД (флавинадениндинуклеотид), которые принимают участие в многочисленных ферментативных реакциях. Флавиногенные дрожжи *Candida famata* сверхпродуцируют рибофлавин в условиях дефицита железа в среде, хотя регуляция этого процесса плохо исследована. Предварительно идентифицированный регуляторный ген *SEF1* кодирует транскрипционный активатор. Его делеция блокирует способность дрожжей к сверхсинтезу рибофламина в условиях дефицита железа. Также известно, что у патогенных флавиногенных дрожжей *C. albicans*, Sfu1 (фактор транскрипции GATA-типа) подавляет экспрессию гена *SEF1*. В процессе работы было показано, что делеция гена

SFU1 C. famata приводит к повышению уровня синтеза рибофламина.

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, pp. 321–60. 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 famata*: an overview, *Biotechnol. Bioproc. Engin.*, 2001, vol. 6, pp. 75–88. doi: 10.1007/bf02931951.
3. Dmytruk, K.V., Yatsyshyn, V.Y., Voronovsky, A.Y., Fedorovych, D.V., and Sibirny, A.A., Construction of riboflavin (vitamin B₂) overproducers of the yeast *Candida famata*, *Sci. Innovat.*, 2009, vol. 5, no. 6, pp. 70–4. doi: 10.15407/scin5.06.070.
4. 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.
5. 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.
6. Kato, T., Park, E.Y., Riboflavin production by *Ashbya gossypii*, *Biotechnol. Lett.*, 2012, vol. 34, pp. 611–8. doi: 10.1007/s10529-011-0833-z.
7. Schwechheimer, S.K., Park, E.Y., Revuelta, J.L., Becker, J., and Wittmann, C., Biotechnology of riboflavin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol. 100, pp. 2107–19. doi: 10.1007/s00253-015-7256-z.
8. Burgess, C.M., Smid, E.J., and van Sinderen, D., Bacterial vitamin B₂, B₁₁ and B₁₂ overproduction: an overview, *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, vol. 133, no. 1–2, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.012.
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, *Metab. Eng.*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 82–8. doi: 10.1016/j.ymben.2010.10.005.
10. Dmytruk, K.V., Sibirny, A.A., *Candida famata* (*Candida flareri*), *Yeast*, 2012, vol. 29, no. 11, pp. 453–8. doi: 10.1002/yea.2929.
11. 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.biotech.2013.12.005.
12. 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.
 13. Lan, C.Y., Rodante, G., Murillo, L.A., Jones, T., Davis, R.W., Dungal, J., Newport, G., and Agabian, N., Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*, *Mol. Microbiol.* 2004, vol. 53, pp. 1451–69. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04214.x.
 14. 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.
 15. Voronovsky, A.A., Abbas, C.A., Fayura, L.R., Kshanoska, 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.
 16. Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual second ed.*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 17. Chen, C., Pande, K., French, S.D., Tuch, B.B, and Noble, S.M., An Iron Homeostasis Regulatory Circuit with Reciprocal Roles in *Candida albicans* Commensalism and Pathogenesis, *Cell Host Microbe*, 2011, vol. 18, no. 2, pp. 118–35. doi: 10.1016/j.chom.2011.07.005.

Надійшла в редакцію 10.03.20
Після доопрацювання 24.03.20
Прийнята до друку 18.09.20