

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Директор Інституту біології клітини НАН України  
(посада)

Сибірний Андрій Андрійович

ПІБ

25277758  
(підпис)

М.П.



**АНОТОВАНИЙ ЗВІТ**  
**про виконану роботу в рамках реалізації проєкту**  
**із виконання наукових досліджень і розробок**  
**Створення держтових продуцентів нових флавінових антибіотиків**

**Назва конкурсу:** Конкурс НФДУ “Наука для безпеки людини та суспільства”

**Реєстраційний номер Проєкту:** 2020.01/0090

**Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок** (реєстраційний номер та назва Проекту) 2020.01/0090, Створення держтових продуцентів нових флавінових антибіотиків

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу “Наука для безпеки людини та суспільства” (назва конкурсу) протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21

## 1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту

Початок – 27.10.2020 (дата укладання Договору про виконання наукових досліджень і розробок);  
Закінчення – 16.12.2021 рік.

Загальна вартість Проєкту, грн. 4 958 500,00 (четири мільйони дев'ятсот п'ятдесят вісім тисяч п'ятсот грн.)

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 2 500 000,00 (два мільйони п'ятсот тисяч грн)

2-й рік 2 458 500,00 (два мільйони чотириста п'ятдесят вісім тисяч п'ятсот грн.)

## 2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту заличено 7 виконавців, з них:

доктори наук 3;

кандидати наук 2;

інші працівники 2.

## 3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Грантоотримувач: Інститут біології клітини НАН України, код за ЄДРПОУ 25255758, КВЕД 72.11, відомча підпорядкованість – НАН України.

#### 4. ОПИС ПРОЄКТУ

##### 4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Конструювання рекомбінантних штамів дріжджів *C. famata*, здатних до надпродукції антибіотиків амінорибофлавіну та розеофлавіну методом гетерологічної експресії цільових генів з бактерії *Streptomyces davaonensis*.

##### 4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

- Розробити систему мультикопійної інтеграції цільових послідовностей ДНК в геном дріжджів *Candida famata*.
- Оптимізувати CRISPR-Cas9 систему для *C. famata*
- Отримати трансформанти дріжджів *Candida famata* що містять гени *FMN1*, *rosB*, *rosA*, *rosC* під контролем сильного промотора.
- Оптимізувати умови ферментації для посилення надсинтезу АФ і РоФ та розробити схеми очистки АФ і РоФ

##### 4.3. Детальний зміст Проєкту:

###### - Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Нозокоміальні інфекції викликають серйозну загрозу, в тому числі і у складних випадках COVID-19. Нозокоміальні штами полірезистентні до протимікробних препаратів. Розеофлавін є природним аналогом рибофлавіну (РФ), що продукується бактеріями *Streptomyces davaonensis*. Розеофлавін і амінорибофлавін перспективні антибіотики широкого спектру дії, що транспортується у клітини бактерій через транспортні системи РФ.

###### - Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Оригінальність даного проекту полягає у конструюванні продуцентів бактерійних антибіотиків на основі дріжджів. Окрім поліпшених продуцентів розеофлавіну планується вперше отримати продуценти його попередника амінорибофлавину. Отримання цієї сполуки за допомогою мікроорганізмів не описано взагалі.

###### - Методологія дослідження (до 400 знаків)

Для виконання запланованих завдань використовувалися стандартні молекулярно-біологічні методи, а саме виділення та очистка ДНК, розділення фрагментів ДНК в агарозному гелі, елюція, обробка ендонуклеазами рестрикції, дефосфорилювання, лігування, ПЛР, трансформація бактерій та дріжджів. Також використовувалися методи біоінформатичного аналізу та аналітичної хімії.

#### 5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

##### 5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Для розробки системи мультикопійної інтеграції для дріжджів *Candida famata* було використано селективний маркер, ген *SAT*, що забезпечує резистентність до антибіотика норзеотрицину. Було отримано колекцію дріжджових трансформантів на зростаючих концентраціях антибіотику (40, 75, 100, 150 мг/л) в середовищі, в той час як для селекції трансформантів з однією копією цільової плазміди було використано норзеотрицин в концентрації

10 мг/л. Для розробки системи CRISPR-Cas9 було сконструйовано серію рекомбінантних плазмід, що містять ген *CAS9* під контролем сильного конститутивного промотора гена *TEF1 C. famata*, гомологічного промотора гена *MAL2*, що активується на середовищі з мальтозою та гетерологічного конститутивного промотора гена *ENO1 Candida albicans*. Експресію послідовності спрямовуючої РНК (gRNA), що впізнає послідовність гена *ADE2*, здійснювали під контролем сильного промотора *TEF1*, а послідовність gRNA фланкували ділянкою аланінової тРНК з 5'-кінця та послідовністю рибозиму вірусу HDV з 3'-кінця для уникнення постранскрипційних модифікацій gRNA. Отримано дріжджові трансформанти відповідними конструкціями. Проводиться оцінка частоти появи колоній дріжджів рожевого кольору, що свідчить про пошкодження гена *ADE2*. Проведено адаптацію послідовностей генів *rosB* та *rosA* *Streptomyces davaonensis* для експресії в геномі *C. famata*. Отримано відповідні синтетичні конструкти. Гени *FMN1 C. famata*, *rosB* та *rosA S. davaonensis* клоновано під контроль конститутивного промотора гена *TEF1* у складі інтегративних плазмід. Ген *IMH3 Debaryomyces hansenii*, що кодує інозинмонофосфатдегідрогеназу було клоновано у склад відповідних плазмід. Ген *IMH3* забезпечує стійкість до мікофенольної кислоти та буде використано як селективний маркер для відбору цільових дріжджових трансформантів

Для отримання продуцента амінорибофлавіну, у штам *Candida famata* здатний до надсинтезу ФМН було введено вектор, що містить касету експресії гена *rosB Streptomyces davaonensis* та селективний маркер, ген *IMH3*, що забезпечує резистентність до мікофенольної кислоти (МФК). Трансформанти відбирали на середовищі із додаванням зростаючих концентрацій МФК. Хроматографічний та масспектрометричний аналіз виявив амінорибофлавін, що нагромаджував отриманий рекомбінантний штам у культуральному середовищі у концентрації 5,2 мг/л. Для отримання продуцента розеофлавіну плазміда, що містить касети експресії генів *FMN1*, *rosB*, *rosA* під контролем сильного промотора гена *TEF1* було введено у надпродуценти рибофлавіну. Селекцію трансформантів проводили на середовищі з додаванням МФК. Було отримано декілька штамів, що не виявляли продукції розеофлавіну. Для отримання більшої колекції трансформантів було використано альтернативний селективний маркер, ген *SAT*, що забезпечує резистентність до антибіотика норзоетрицину. Сконструйовано вектор, що містить маркерний ген *SAT* та гени синтезу розеофлавіну *FMN1*, *rosB*, *rosA*. Було проаналізовано більше сотні трансформантів, однак продукції розеофлавіну не спостерігали. Ідентифіковано новий ген шляху синтезу розеофлавіну *rosC*, що кодує фосфатазу, яка перетворює 8-диметил-8-амінорибофлавін фосфат до 8-диметил-8-амінорибофлавіну. Цей ген було введено у склад попередньо сконструйованого вектора. Отримано трансформанти, що містять чотири гена *FMN1*, *rosB*, *rosA* та *rosC*. За допомогою qPCR підтверджено посилення експресії цільових генів. Розроблено методику визначення питомої активності ключового ферменту синтезу розеофлавіну RosA у дріжджів. Кількості розеофлавіну у культуральному середовищі, достатні для визначення за допомогою рідинної хроматографії високого тиску, не виявлено. Для конструкції дріжджового продуцента розеофлавіну, як вихідний, було використано штам *Pichia pastoris* з посиленою експресією генів *FMN1*, *rosB* та *rosA*. Посилення продукції розеофлавіну вимагає додаткової експресії гена *rosC*. Особливістю штаму *P. pastoris* є відсутність ефективних селективних маркерів. Для введення касети експресії гена *rosC* було сконструйовано низку плазмід, що містили різні селективні маркери, зокрема гени *SUC2* (кодує інвертазу) *IMH3* (інозинмонофосфатдегідрогеназа) *BSD* (ген стійкості, що забезпечує резистентність до антибіотика бластоцидину). Було отримано відповідні трансформанти лише з використанням гена *BSD*. Встановлено, що сконструйований штам *P. pastoris* з посиленою експресією генів *FMN1*, *rosB*, *rosA* та *rosC* продуктує розеофлавін у концентрації 3 мг/л.

Розроблено схему виділення та очищення амінорибофлавіну та розеофлавіну з культуральної рідини сконструйованих штамів та отримано препаративні кількості цих антибіотиків. Схема очищення включає три етапи: очистку на колонці з Florisil, концентрування випаровуванням та очистку на колонці з целюлозою.

Підібрано умови культивування для сконструйованих штамів для максимального нагромадження цих антибіотиків. Оптимізовано умови культивування продуцента розеофлавіну у ферментері. За умов культивування у лабораторному ферментері об'ємом 1 л, рекомбінантний штам *P. pastoris* продуктував 46 мг/л розеофлавіну.

Перелік публікацій за проектом:

1. Tsyrulnyk AO, Fedorovych DV, Dmytruk KV, Sibirny AA. Overexpression of riboflavin excretase enhances riboflavin production in the yeast *Candida famata*. Methods Mol Biol. 2021;2280:31-42. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6_3).
2. Fedorovych DV, Dmytruk KV, Sibirny AA. Recent Advances in Construction of the Efficient Producers of riboflavin and flavin nucleotides (FMN, FAD) in the yeast *Candida famata*. Methods Mol Biol. 2021;2280:15-30. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6_2).
3. Justyna Ruchala, Dariya V. Fedorovych, Andriy O. Tsyrulnyk, Svitlana Sobchuk, Yulia Andreieva, Alicja Vojtun, Kostyantyn V. Dmytruk, Andriy A. Sibirny Construction of the advanced producer of riboflavin on whey in the flavinogenic yeast *Candida famata*. The World Microbe Forum, 2021
4. Andreieva Y, Petrovska Y, Tsyrulnyk A, Sobchuk S, Wen Liu, Fayura L, Fedorovych D, Ruchala J, Yingqian Kang, Sibirny A., Dmytruk K. The flavinogenic yeast *Candida famata* as a promising producer of riboflavin and its derivatives The World Microbe Forum, 2021
5. Dmytruk K, Tsyrulnyk A, Fayura L, Fedorovych D, Dmytruk O, Motyka O, Chshanovski G, Broda D, Marx H, Mattanovich D, Sibirny A, Ruchala J. Development of yeast producers of flavine antibiotics. The World Microbe Forum, 2021
6. Fedorovych D, Tsyrulnyk 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 (IBTRS) 2021

#### **5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами**

Запланована робота є унікальною, існуючих аналогів немає.

#### **5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проекту для економіки та суспільства (стосується проектів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)**

На сьогодні розеофлавін виробляється виключно за допомогою хімічного синтезу та присутній на ринку у міліграмових кількостях з вартістю близько 25 €/мг, що накладає обмеження у його використанні. Тоді як амінорибофлавін комерційно не виробляється взагалі.

#### **5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проекту в суспільній практиці.**

Конструювання рекомбінантних штамів дріжджів, здатних до надсинтезу розеофлавіну та амінорибофлавіну дозволить розпочати роботи по опрацюванню технології промислового отримання достатніх кількостей цих перспективних антибактеріальних препаратів для їх широкого застосування у медицині і ветеринарії.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

**Науковий керівник Проекту**

заступник директора Інституту біології клітини НАН України

(посада)

Дмитрук Костянтин Васильович

ПІБ

(підпис)

