Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0822U101019

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 10-12-2022

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Андреєва Юлія Андріївна
2. Andreieva Yuliia Andrijivna

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: доктор філософії

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 091

Назва наукової спеціальності: Біологія. Біологія

Галузь / галузі знань:

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 12-10-2022

Спеціальність за освітою: Біологія

Місце роботи здобувача:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): ДФ 35.246.003

Повне найменування юридичної особи: Інститут біології клітини Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: вул. Драгоманова, буд. 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут біології клітини Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: вул. Драгоманова, буд. 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик: 34.19.19, 34.27

Тема дисертації:

1. Механізми дії нових регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів
2. Mechanisms of action of new regulatory factors of the riboflavin synthesis by flavinogenic yeasts

Реферат:

1. Дисертаційна робота висвітлює підходи метаболічної інженерії задля виявлення нових закономірностей у регулюванні біосинтезу рибофлавіну флавіногенними дріжджами Candida famata та подальшого застосування цих знань з метою створення стабільних суперпродуцентів цієї сполуки. Рибофлавін (вітамін B2, або лактофлавін) відіграє важливу роль у метаболізмі живих організмів. Він є попередником флавінових кофакторів флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД). Зниження концентрації вітаміну B2 призводить до інгібування проліферації клітин, до запальних захворювань, таких як інфекційні запалення шкіри, хейліти, глосит, сепсису, катаракта та мігрені. У промисловій продукції рибофлавіну дріжджі, як одноклітинні еукаріоти, мають вагомі переваги у біотехнологічних процесах порівняно із грибами та бактеріями. Розробка методів трансформації та запровадження метаболічної інженерії для модифікації геному цих організмів вже довели існування цікавого та перспективного напряму дослідження.

Тому метою цієї роботи була ідентифікація та дослідження принципів дії нових чинників, залучених у процеси біосинтезу рибофлавіну флавіногенними дріжджами Candida famata. Нами сконструювано штами дріжджів C. famata із пошкодженим геном синтезу субодиниці вакуолярної АТФ-ази (аденозонтрифосфатаза). Отримання делеційного мутанта дозволило продемонструвати, що ген VMA1 здійснює регуляторний вплив на утворення рибофлавіну досліджуваними дріжджами. У перерахунку на грам біомаси, отриманий штам продукує у 27 разів більше рибофлавіну, ніж вихідний штам. Крім того, ці дріжджі проявляли чутливий до температури фенотип. Ріст та флавіногенез штаму значно погіршилися при культивуванні за температури 35°C. Однак, одночасно вдалося з'ясувати, що батьківський штам C. famata є більш термотолерантним і, у відповідь на підвищенні температури, розпочинає синтезувати більше рибофлавіну, ніж при рості за 28°C. Нами вивчено питання впливу промоторів гена SEF1 із різних, флавіногенних та нефлавіногенних, дріжджових організмів на ініціацію утворення рибофлавіну. Встановлено, що промотори SEF1 із флавіногенних дріжджів C. albicans та, меншою мірою, C. tropicalis, злиті з ВРЗ гена SEF1 із C. famata, впливають на здатність до відновлення надпродукції рибофлавіну у sef1Δ. Цей метод надекспресії гена допоміг підвищити рівень синтезу метаболіта у 20 разів. Завдяки додатковому посиленню експресії гена GND1 вдалося підвищити вміст рибофлавіну у культуральній рідині у 2; 1,5 та 1,3 рази, порівняно із вихідними штамами L20105, AF-4 та BRP. Ми також показали, що надекспресія гена ZWF1, навпаки, інгібує біосинтез рибофлавіну та ростові процеси загалом. У дисертаційній роботі вперше показано позитивний ефект дерепресії гена 6-фосфоглюконатдегідрогенази на синтез вітаміну B2 флавіногенними дріжджами. Мутанти, що мали надекспресію обидвох генів ПФШ, а саме L20105/ZWF1/GND1, AF-4/ZWF1/GND1 та BRP/ZWF1/GND1 характеризувалися лише мінорним збільшенням кількості флавінів (не більше ніж у 1,05 рази, порівняно із батьківськими штамами). Виявлено, що надекспресія гена SOL3 також здатна впливати на надсинтез рибофлавіну. Хоча цей позитивний вплив дуже незначний (збільшення виходу вітаміну на один грам біомаси від 1,05 до 1,5 разів), проте розкриває ще ширший потенціал обраного напрямку дослідження. Отже, надекспресія гена SOL3 у комбінації з GND1 та/або ZWF1 може привести до значно більшого накопичення рибофлавінового попередника Ру5Ф, а отже, ще більше стимулювати утворення рибофлавіну. Ми також підтвердили, що мутантам із індукованою експресією гена фермента 6-фосфоглюконатдегідрогенази властиво синтезувати ще більші кількості рибофлавіну на середовищі з лактозою як єдиним джерелом Карбону. Так, вирощування штамів на молочній сироватці, в якій лактоза є єдиним джерелом вуглецю, сприяло ще більш інтенсивному утворенню вітаміну B2. Загалом зміна середовища культивування дозволила збільшити рівень синтезу у 1,4; 1,7 та 1,7 для штамів L20105/GND1, AF-4/GND1 та BRP/GND1, порівняно із синтезом на мінеральному середовищі з глюкозою. Ми вперше дослідили локалізацію білка-екскретази Rfe1 (RiboFlavin Excretase) у дріжджів C. famata. Прикріплення флуоресцентної мітки до цього білка дозволило виявити, що Rfe1 знаходиться у плазматичній мембрані. Показали, що цей протеїн не функціонує у ядрі. Викладені дані експериментальних досліджень є значущими для розуміння певних механізмів контролю над біосинтезом рибофлавіну. На щастя, у сучасному світі відбувається поступове виявлення дослідниками нових регуляторних чинників флавіногенезу. Наш вклад у цей поступ є важливим та може, в подальшому, сприяти створенню нових стабільних надпродуцентів рибофлавіну, а отже, підвищити рентабельність виробничих процесів. Зокрема, використання сироватки як субстрату для росту штамів дає ширші можливості зробити процес дешевшим і сприятливим для збереження стану навколишнього середовища, оскільки сироватка, зазвичай, утворюється як відходи молочної промисловості.

2. This dissertation clarifies metabolic engineering applications to reveal new correlations of regulation in riboflavin synthesis by flavinogenic yeasts Candida famata. The data can be further applied to create stable superproducers of riboflavin. Riboflavin (vitamin B2, or lactoflavin) plays a crucial role in the metabolism of living organisms. It is a precursor of flavin cofactors flavin mononucleotide (FMN) and flavinadine dinucleotide (FAD). Decreased concentration of vitamin B2 in cells leads to inhibition of their proliferation, inflammatory diseases such as infectious skin inflammation, cheilitis, glossitis, sepsis, cataracts, and migraines. Yeasts, as unicellular eukaryotes, have significant prerogatives in biotechnological processes compared to fungi and bacteria. The genome modification of these organisms by using metabolic engineering has already shown the existence of an

interesting and promising area of research. Thus, the aim of this work is to identify and study the principles of action of new factors involved in the biosynthesis of riboflavin by the flavinogenic yeast C. famata. We have constructed the C. famata strains with a damaged gene for the synthesis of the vacuolar ATPase subunit. Obtaining deletion mutants allowed us to demonstrate that the VMA1 gene has a regulatory effect on the formation of riboflavin by them. The resulting strain produces 27 times more riboflavin than the original strain by one gram of cells. These yeasts showed a temperature-sensitive phenotype. The growth and flavinogenesis of the strain deteriorated significantly when cultivated at 35°C. It was found that the parental strain of C. famata is more thermotolerant and, in response to increasing temperature, starts to synthesize more riboflavin than when grown at 28 °C. We also examine the influence of SEF1 gene promoters from flavinogenic and non-flavinogenic yeasts on the initiation of riboflavin formation. We found that SEF1 promoters from the flavinogenic yeast C. albicans and, to a lesser extent, the non-flavinogenic yeast C. tropicalis, fused to the ORF of the SEF1 gene from C. famata, affect the ability to restore riboflavin overproduction in sef1Δ. This method of overexpression of the gene allowed to increase in the level of metabolite synthesis by 20 times. We have discovered that due to additional enhancement of GND1 gene expression it is possible to increase the content of riboflavin in the culture fluid by 2, 1.5 and 1.3-fold, compared to the original strains L20105, AF-4 and BRP. We have shown that overexpression of the ZWF1 gene inhibits riboflavin biosynthesis and growth processes of mutants. For the first time we describe the positive effect of derepression of the 6-phosphogluconate dehydrogenase gene on the synthesis of riboflavin by flavinogenic yeast was shown. Mutants that overexpressed both genes of PPP, namely L20105/ZWF1/GND1, AF-4/ZWF1/GND1 and BRP/ZWF1/GND1 were characterized only by a minor increase in the content of flavins (no more than 1.05 times compared to the parent strains). We found that overexpression of the SOL3 gene can also affect riboflavin oversynthesis. The increase in vitamin yield per gram of biomass from 1.05 to 1.5 times. This data suggests that overexpression of the SOL3 gene in combination with GND1 and/or ZWF1 may lead to significantly greater accumulation of the riboflavin precursor Ru5P, and thus further stimulate riboflavin production. We also confirmed that mutants with induced gene expression of the enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase tend to synthesize even greater amounts of riboflavin on a medium with lactose as a single source of carbon. Thus, the cultivation of strains on milk whey, in which lactose is the only source of carbon, contributed to an even more intense formation of vitamin B2. In general, changes in the culture medium allowed to increase the level of synthesis by 1.4, 1.7 and 1.7 for strains L20105/GND1, AF-4/GND1 and BRP/GND1, compared to synthesis on mineral medium with glucose. We were first, who investigated the localization of the transporter protein Rfe1 (RiboFlavin Excretase) in the yeast C. famata. Binding a fluorescent label to this protein revealed that Rfe1 is located in the plasma membrane. We have proven that Rfe1 does not function in the nucleus. The presented experimental data are important for understanding certain mechanisms of control over riboflavin biosynthesis. Fortunately, in the modern world, researchers are gradually discovering new regulatory factors of flavinogenesis. Our contribution to this progress is important and may, in the future, contribute to the creation of new stable overproducers of riboflavin, and thus increase the profitability of production processes. In particular, the application of whey as a substrate for the growth of strains provides greater opportunities to make the process cheaper and more environmentally friendly as the whey is usually disposed of as waste from the dairy industry.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Сибірний Андрій Андрійович
2. SYBIRNYY Andriy Andriyovych

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.15

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Корнійчук Олена Петрівна
2. Korniichuk Olena Petrivna

Кваліфікація: д.мед.н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Осташ Богдан Омелянович

2. Ostash Bohdan Omelyanovych

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.22

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Закальський Андрій Євстахович

2. Zakalskiy Andriy Ye.

Кваліфікація: к. б. н., 03.00.04

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Стасик Олег Володимирович

2. Stasyk Oleh Volodymyrovych

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.11

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради	Гончар Михайло Васильович
Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні	Гончар Михайло Васильович
Відповідальний за підготовку облікових документів	
Реєстратор	
Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності	Юрченко Т.А.