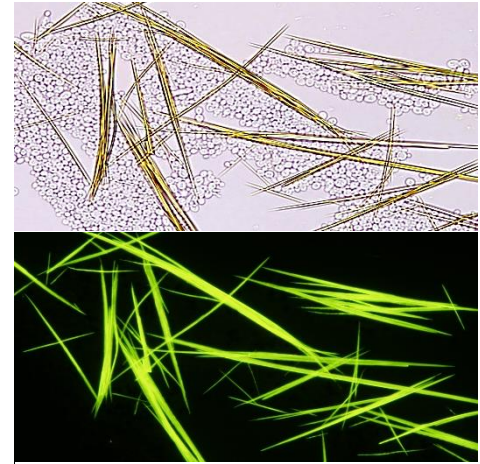


Ryboflawina, znana również jako witamina B₂, jest niezbędna do życia i prawidłowego funkcjonowania zwierząt i ludzi, dlatego musimy dostarczać ją w pożywieniu. Istnieje wiele badań wykazujących prozdrowotne i przeciwchorobotwórcze działanie ryboflawiny, głównie działanie przeciwzapalne. Ryboflawina bierze udział w produkcji czerwonych krwinek, jest z powodzeniem stosowana w leczeniu niedoboru żelaza (anemii) i pomaga zmniejszyć negatywne skutki chorób oczu, takich jak zaćma. Przyjmowanie suplementów ryboflawiny jest również lekarstwem na migreny. Ryboflawina otrzymywana jest biotechnologicznie przy użyciu głównie modyfikowanych szczepów *Bacillus subtilis* i *Ashbya Gossypii* jednak ze względu na kilka zalet, flawinogenne drożdże *Candida famata* mogą nadal z nimi konkurować. Z biegiem lat, dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik inżynierii genetycznej uzyskano wiele szczepów, które nadprodukują ryboflawinę, również na różnych odpadach, w tym hydrolizatach lignocelulozowych i serwatce serowej. Konieczne jest skupienie się na genach zaangażowanych w szlak biosyntezy i zrozumienie mechanizmów regulacyjnych.



1. Widoczne kryształy ryboflawiny wytwarzane przez drożdże *C. famata* i fluorescencja kryształów w świetle UV.

W ostatnich latach tendencja do ochrony środowiska nasila się i dotyczy głównie redukcji zanieczyszczeń oraz, biorąc pod uwagę fakt, że kiedyś wyczerpią się naturalne źródła energii, poszukiwania alternatywnych źródeł energii i ponownego wykorzystania odpadów (recykling). Jednym z najważniejszych w biotechnologii są odpady roślinne, które po odpowiedniej obróbce wstępnej (hydrolizie) mogą być ponownie wykorzystane jako źródło węgla, na przykład *bagassa*. Ponadto powszechny głód na świecie sprawia, że nieetyczne jest wykorzystywanie w przemyśle surowców bogatych w cukier, tj. zbóż czy trzciny cukrowej, natomiast odpady lignocelulozowe, największe źródło odnawialnej biomasy, traktowane są jako odpady niejadalne, co stanowi dodatkowy atut. Obecnie energia pozyskiwana z biomasy stanowi już ponad 14% światowego zużycia energii, ale należy zadać pytanie, czy możemy efektywniej wykorzystywać te surowce?

Dotychczas hydrolizaty były z powodzeniem stosowane w przemyśle do produkcji przez mikroorganizmy związków użytecznych, np. biodiesla, biowodoru, lipidów, karotenoidów czy nawet polimerów. Jak wykazaliśmy, nasze rekombinowane szczepy *C. famata* są w stanie rosnąć i wytwarzać ryboflawinę na hydrolizatach lignocelulozowych, a my już podjęliśmy kroki, aby uczynić ten proces bardziej wydajnym.

Odpady lignocelulozowe muszą być przetwarzane poprzez wstępną obróbkę i hydrolizę, niestety dużym problemem są inhibitory powstające podczas tych procesów, głównie kwasy, furany i fenole, silnie oddziałują na komórki, uszkadzając białka, lipidy i DNA, w konsekwencji prowadząc do śmierci komórek, a z biotechnologicznego punktu widzenia zatrzymują cały proces produkcji. Obecnie jednak niewiele wiadomo na temat genów, które mogłyby jednocześnie przeciwdziałać toksycznemu działaniu inhibitorów i zwiększać efektywność produkcji ryboflawiny przez *C. famata*. Bardzo ważnym aspektem jest również zwiększenie zdolności wykorzystania glukozy i ksylozy, dwóch głównych cukrów obecnych w hydrolizacie. W wielu gatunkach drożdży zidentyfikowano różne geny, które mają realny wpływ na poprawę produkcji z biomasy lignocelulozowej. **Dlatego naszym głównym celem niniejszej propozycji jest próba analizy genów, które mogłyby znacząco poprawić zdolność do wytwarzania ryboflawiny przez flawinogenne drożdże *C. famata* (*Candida flareri*, teleomorf, *Debaryomyces subglobosus*) na hydrolizatach lignocelulozowych.**

W pierwszej kolejności chcemy poprawić wykorzystanie głównych cukrów w hydrolizatach, tj. glukozy i ksylozy, poprzez nadekspresję genów odpowiedzialnych za szlaki wykorzystania tych cukrów. Zainspirowani podobnymi badaniami nad *S. cerevisiae* i *O. polymorpha*, chcemy uzyskać nadekspresję genów z grup *HGT* i *XYL*. Wstępne badania potwierdziły, że nadekspresja *XYL1* zwiększa wykorzystanie ksylozy w stosunku do wyjściowego szczepu na podłożu mineralnym. Skuteczna detoksykacja szkodliwych inhibitorów w podłożach fermentacyjnych pozostaje wyzwaniem. Aby temu przeciwdziałać, zamierzamy przeprowadzić mutagenезę ewolucyjną w bioreaktorze, poprzedzoną mutagenезą UV w celu zwiększenia częstości mutacji. Następnie zaplanowaliśmy również całkowite sekwencjonowanie genomu najbardziej opornych mutantów, co pozwoli nam porównać sekwencje i zmiany w genach. Po sekwencjonowaniu geny, które mogą znacząco przyczynić się do poprawy produkcji, zostaną przeanalizowane, a następnie amplifikowane przez PCR i wprowadzone do komórki za pomocą plazmidu. Pomyślna realizacja tych planów przełoży się na głębszy wgląd w mechanizmy regulujące syntezę ryboflawiny na hydrolizatach lignocelulozowych.