

Projekto Nr. 10-038-T-0062 „ MTEP idėjos tikrinimas - fluorescencinio reporterinio geno integravimo metodo vystymas siekiant aptikti aromatinius junginius bioremediacijos potencialą turinčiose sfingomonadose“ ataskaita

Kvietimo numeris: 10-038-T

Kvietimo pavadinimas: Parama identifikuotiems startiniams MTEP projektams ir galimybių studijoms su institucijų kelrodžiais sėkmingam dalyvavimui Europos Sąjungos mokslinių tyrimų ir inovacijų programos „Europos horizontas“ kvietimuose skatinti

Projekto kodas: 10-038-T-0062

Projekto pavadinimas: MTEP idėjos tikrinimas - fluorescencinio reporterinio geno integravimo metodo vystymas siekiant aptikti aromatinius junginius bioremediacijos potencialą turinčiose sfingomonadose

Projektu sprendžiamos problemos:

Viena iš Lietuvos Respublikos švietimo, mokslo ir sporto ministerijos mokslo plėtros programos pažangos priemonės Nr. 12-001-01-02-01 problemų yra Gebėjimų ir paskatų rengti tarptautines MTEP paraiškas trūkumas. Šiuo projektu prisidedama prie minėtos problemos sprendimo – buvo patikrinta idėja pagal „Europos horizontas“ programos 2025-2027 m. strateginį planą. Idėja apima fluorescuojančio baltymo įvedimą į sfingomonadų grupės bakterijas ir pritaikymą aromatiniais junginiais indukuojamų sistemų įvertinimui, bei pilnos ląstelės biojutiklių vystymui su galimybe kiekybiškai įvertinti aromatinius junginius. Sfungomonadų bakterijų grupei priskiriamos alfa proteobakterijos esančios Sphingomonadaceae ir Erythrobacteraceae šeimose. Gilinant į mokslinę literatūrą buvo pastebėtas sfingomonadų potencialas bioremediacijoje, šios bakterijos dažnai aptinkamos užterštoje aplinkoje ir gali metabolizuoti teršalus, tokius kaip pesticidai (Sharma, et al. 2021, Li, et al. 2020), policikliniai aromatiniai junginiai (Jiang, et al. 2022, Al Farraj, et al. 2021, Li, et al. 2023, Dinh, Nguyen and Nguyen 2023, Mutter and Zylstra 2021), bisfenolis A (Jung, et al. 2021), organofosfatai (Yu, et al. 2023), sunkieji metalai (Mahbub, et al. 2016, Lee, Lee and Cho 2023) ar kiti lakieji organiniai junginiai (Singh, Pandey and Dubey 2023, Larke-Mejía, et al. 2020). Paminėti teršalai yra kenksmingi žmogaus ir gyvūnų sveikatai, kai kurie iš jų yra įvardinti kaip kancerogenai, kaip pvz. policiklinis aromatinis junginys benzopirenas ar pesticidai pentachlorofenolis ir gamma-heksachlorocikloheksanas. Šie teršalai yra tirpūs ir

labai stabilūs vandenyje, gali lengvai paplisti aplinkoje, patekti į vandens telkinius (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2018, Flood and Copley 2018). Iki šiol buvo pasiektas ne mažas progresas siekiant suprasti aromatinių junginių katabolizmą sfingomonadose, tačiau genetinės inžinerijos ir biotechnologijos pritaikymas iki šios nėra išplėtotas šiose bakterijose, lyginant su tokiais modeliniais mikroorganizmais, kaip *E. coli* ar *S. cerevisiae*. Taip pat nėra sukurta sintetinės biologijos įrankių sfingomonadoms, paremtų indukuojamomis genų ekspresijos sistemomis ir tinkamų stebėti ir kontroliuoti genų ekspresiją ir aromatinių junginių metabolizmą. *Sphingobium* sp. SYK-6 kamienas yra plačiausiai ištyrinėtas iš sfingomonadų grupės bakterijų (Kamimura, Takamura, et al. 2010, Kasai, et al. 2012, Kamimura, Takahashi, et al. 2017, Araki, Umeda, et al. 2019, Araki, Tanatani, et al. 2020, Bleem, et al. 2023) ir yra artimas aukštą bioremediacijos potencialą turintiems sfingomonadoms *Sphingomonas wittichii* RW1 (Mutter and Zylstra 2021) ir *Sphingobium indicum* UT26S (Nagata, et al. 2011). Dėl šių priežasčių, šiame projekte pasirinkta dirbti su *Sphingobium* sp. SYK-6, kaip modeliniu mikroorganizmu sfingomonadų grupei. Norime patikrinti idėją, kad sfingomonadų grupės bakterijoms galima išvystyti metodą reporterinio geno įvedimui į genomą ir pritaikymui kaip visos ląstelės biojutiklio aromatinių junginių katabolinių kelių nagrinėjimui ir aromatinių junginių įvertinimui

Tyrimo tikslas:

Patikrinti idėją, kad galima sukurti metodą, skirtą įterpti fluorescuojantį baltymą į sfingomonadų grupės bakterijas aromatinių junginių aptikimui ir bioremediacijos procesų gerinimui

Tyrimo uždaviniai:

1. Identifikuoti fluorescuojantį baltymą tinkamą ekspresijai alphaproteobakterijose, įskaitant sfingomonadų grupės atstovus.
2. Identifikuoti genetinę vietą ir indukuojamą genų ekspresijos sistemą tinkamą fluorescejuočio baltymo įterpimui.
3. Optimizuoti konjugacijos metodą, tinkantį sfingomonadų grupės bakterijoms, atsižvelgiant į jų natūralų atsparumą ir genetinę indžineriją apsunkinančius veiksnius.
4. Charakterizuoti modifikuotas sfingomonadas, įvertinant fluorescencijos intensyvumą, stabilumą ir poveikį ląstelių augimui.
5. Įvertinti genetiškai modifikuotų bakterijų gebėjimą aptikti aromatinis junginius, naudojant fluorescencijos pokyčius.

Hipotezės:

Sfingomonadų grupės bakterijoms galima stabiliai įterpti ir ekspresuoti fluorescuojantį baltymą, kuris, sujungtas su specifiniais promotoriais, reaguojančiais į aromatinius junginius, leis sukurti biosensorinį įrankį, gebantį aptikti šiuos junginius bei pagerinti bioremediacijos procesų efektyvumą.

Tyrimo objektas:

Sfingomonadų genties bakterijos, turinčios potencialą biodegraduoti aromatinius junginius, kuriose kuriamas ir tiriamas fluorescencinio reporterinio geno integravimo metodas, siekiant: sukurti biologinį jutiklį, gebantį fluorescenciniu signalu reaguoti į aromatinius junginius aplinkoje, Sfingomonadų grupės bakterija *Sphingobium* sp. SYK-6 priklauso sfingomonadų grupei – tai gramneigiamos, aerobinės bakterijos, pasižyminčios išskirtiniu gebėjimu skaidyti aromatinius junginius, ypač kylančius iš lignino degradacijos. SYK-6 padermė išsiskiria tuo, kad jos genomu koduojami platūs kataboliniai keliai, leidžiantys efektyviai detoksikuoti įvairius fenolinių junginių darinius, įskaitant vanilino rūgštį, ferulatus, sinapatus, *p*-kumaratus bei jų konjuguotas formas. Dėl šios savybės SYK-6 laikomas vienu geriausiai charakterizuotų modeliųjų mikroorganizmų lignino dariniais grindžiamų bioprocesų tyrimuose.

1. Teorinis-metodinis pagrindimas:

Sfingomonados iš alfabroteobakterijų *Sphingomonadaceae* ir *Erythrobacteraceae* šeimų yra gerai žinomos dėl savo gebėjimo skaidyti aromatinius junginius, įskaitant iš lignino gautus biarilus ir monoarilus, sintetines chemines medžiagas ir organinius teršalus (Zhao, et al. 2017, Asaf, et al. 2020, Song, Chen and Xu 2022). *Sphingobium* sp. SYK-6 (Bleem, et al. 2023, Kato, et al. 2025) ir *Novosphingobium aromaticivorans* (Cecil, et al. 2018) patraukė dėmesį dėl savo gebėjimo skaidyti iš lignino gautus fenolio junginius. Be to, policiklinius aromatinius angliavandenilius pireną, antracena, naftalena, karbazolą ir dibenzo-*p*-dioksina gali atitinkamai skaidyti *Sphingomonas* sp. YT1005 (Jiang, et al. 2022), *Sphingomonas* sp. KSU05 (Al Farraj, et al. 2021), *Sphingobium* sp. JS3065 (Li, et al. 2023), *Sphingomonas* sp. KA1 (Dinh, Nguyen and Nguyen 2023)10 ir *S. wittichii* RW1 (Mutter and Zylstra 2021), o pesticidus heksachlorocikloheksaną ir dikamba sunaudoja *Sphingobium indicum* B90A (Sharma, et al. 2021) ir *Rhizorhabdus dicambivorans* Ndbn-20 (Li, et al. 2020). Šie pavyzdžiai pabrėžia sfingomonadų svarbą lignoceluliozės biomasės biokonversijoje ir jų galimą pritaikymą bioremediacijoje.

Nors padaryta didelė pažanga suprantant aromatinių junginių metabolizmą sfingomonadose, šių rūšių bioinžinerija ir biotechnologijų taikymams yra riboti. Visų pirma, nebuvo sukurti sintetinės biologijos įrankiai, tokie kaip metabolitų ir produktų stebėjimo prietaisai. Įrodyta, kad metabolitų indukuojamos genų ekspresijos sistemos yra tinkamos genų ekspresijos ir metabolizmo kontrolei ir stebėjimui (Brecht and Marjan 2025, Kim, Sinnott and Sandoval 2020, Mitchler, et al. 2021). Anksčiau tokios sistemos buvo identifikuotos, o neseniai buvo sukurti atitinkami transkripcijos faktoriaus (TF) pagrindu veikiantys biosensoriai daugumai natūraliai susidarančių fenolio rūgščių (Augustiniene, Kutraite, et al., Transcription factor-based biosensors for detection of naturally occurring phenolic acids 2023, Kutraite and Malys 2023, Kutraite, Augustiniene and Malys 2024). Nepaisant šių pastangų, nė vienas iš tokio tipo prietaisų nebuvo sukurtas ir pritaikytas sfingomonadose. Be to, iki šiol nebuvo sukurtas biosensorius, reaguojantis į siringo rūgštį.

Siringo rūgštis yra žinoma kaip 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzenkarboksirūgštis, pasižyminti antioksidacinėmis, antimikrobinėmis, priešuždegiminėmis, priešvėžinėmis ir antidiabetinėmis savybėmis, ir yra svarbus kaip pirmtakas siringato darinių gamybai (Cheemanapalli, et al. 2018, Gomes da Silva, et al. 2025). Naujausi tyrimai parodė siringo rūgšties fotochemoprotekcinį aktyvumą, silpninantį ultravioletinių B (UVB) spindulių citotoksiškumą (Nunes, et al. 2025). Ji buvo pasiūlyta kaip tinkamas komponentas odos sveikatai, odos vėžio apsaugai ir prevencijai (Ha, et al. 2018). Įrodyta, kad siringo rūgštis slopina *Cronobacter sakazakii* augimą (Shi, et al. 2016) ir pasižymi aktyvumu prieš *Staphylococcus epidermidis* (Minich, et al. 2022), o tai rodo jos, kaip konservanto, potencialą gerinti maisto saugą. Pasaulinė siringo rūgšties rinka 2022 m. buvo įvertinta 0,15 mlrd. JAV dolerių ir tikimasi, kad iki 2030 m. ji pasieks 0,25 mlrd. JAV dolerių, o bendras metinis augimo tempas nuo 2024 iki 2030 m. sieks 7 % (Verified Market Reports 2024). Be to, siringinės rūgšties dariniai, tokie kaip siringaldehidai, naudojami kaip maisto priedas ir turi didelį farmacinį potencialą (Wu, et al. 2022), o siringinės rūgšties esteriai naudojami kaip dantų cemento pirmtakai (Cheemanapalli, et al. 2018).

Siringo rūgštis gaunama ekstrahuojant ją iš augalų ląstelių, kur ji sintetinama šikimato rūgšties keliu (Valanciene, et al. 2020). Tačiau natūraliai susidarančių junginių ekstrakcijai iš augalų reikalingi organiniai tirpikliai arba sudėtingi metodai, įskaitant ekstrakciją mikrobangomis arba ultragarsu (Jesus, et al. 2023, Tapia-Quirós, et al. 2024, de Faria, et al. 2019). Mikrobinių ląstelių fabriku naudojimas tapo pageidaujamu biotechnologiniu metodu pridėtinės vertės junginių gamybai ir galėtų būti taikomas siringinės rūgšties biosintezėje. Kamimura ir kt. anksčiau pademonstravo siringaldehido biotransformaciją į siringinę rūgštį

Sphingobium sp. SYK-6 (Kamimura, Goto, et al. 2017), o Mukherjee ir kt. pranešė apie sinapo rūgšties pavertimą siringine rūgštimi, kurią atlieka siūlinis grybas *Paecilomyces variotii* (Mukherjee, et al. 2006). Tačiau abiem atvejais pasiekti titrai išliko mažesni nei 0,1 g/l (Kamimura, Goto, et al. 2017, Mukherjee, et al. 2006, Kutraite, Augustiniene and Malys, Hydroxybenzoic acids: Microbial metabolism, pathway engineering and products 2025). Siekiant geriau suprasti siringo rūgšties metabolizmą ir tobulinti mikrobu inžineriją, didelis dėmesys buvo skirtas lignino skaidymui ir susijusiam katabolinių genų transkripcijos reguliavimui *Sphingobium* sp. SYK-6 (Kato, et al. 2025, Araki, Tanatani, et al. 2020, Araki, Umeda, et al. 2019). Araki ir kolegų nustatė IclR tipo transkripcijos reguliatorių DesX, kuris kontroliuoja *desA* geno, koduojančio tetrahydrofolato priklausomą O-demetilazę, fermentą, katalizuojantį siringo rūgšties O-demetilinimą 3-O-metilgalate (Araki, Tanatani, et al. 2020), transkripciją.

Šiame tyrime įvertinome siringo rūgšties indukuojamą sistemą ir integravome fluorescencinį reporterinį geną, kontroliuojamą *desA* indukuojamo promotoriaus *Sphingobium* sp. SYK-6. Tai leido mums sukurti pirmąjį fluorescencinio reporterio pagrindu veikiančią visos ląstelės biosensorių siringo rūgšties aptikimui svingomonadose. Siekdami geriau suprasti fenolinių junginių skaidymą *Sphingobium* sp. SYK-6, naudojome *Sphingobium* sp. SYK-6 pagrindu sukurtas visos ląstelės biojutiklis, skirtas dozės ir atsako sąryšiui, dinaminiam diapazonui ir veikimo diapazonui nustatyti naudojant siringatą, vanilatą, sinapatą ir ferulatą. Be to, šis biojutiklis buvo panaudotas siekiant įvertinti *Sphingobium* sp. SYK-6 fenolio rūgščių pasisavinimo eiliškumą.

2. Tyrimo metodai ir priemonės

Bakterijų kamienai ir terpės

Šiame tyrime naudoti bakterijų kamienai pateikti 1 lentelėje. Klonavimui ir plazmidžių dauginimui buvo naudojama *E. coli* Top10 (Invitrogen, JAV), kaip aprašyta (Sambrook and Russell 2001). *E. coli* S17-1 buvo naudojamas kaip konjugacijos donoras. *E. coli* padermės buvo auginamos Luria–Bertani (LB) terpėje. *Sphingobium* sp. SYK-6 ląstelės buvo auginamos 30 °C temperatūroje kratant (200 aps./min.) LB arba Wx-SEMP terpėje (minimali terpė, papildyta 10 mM sacharozės, 10 mM glutamato, 0,34 mM metionino ir 10 mM prolino), kaip aprašyta (Kasai, et al. 2012). Kai reikalinga, *E. coli* terpė buvo papildyta 12,5 µg/ml tetraciklino, SYK-6 ir jo mutantų terpė – 12,5 µg/ml tetraciklino arba 12,5 µg/ml chloramfenikolio.

Klonavimas ir transformacija

Sphingobium sp. SYK-6 ir jos mutantų genomine DNR buvo išskirta naudojant „GenElute Bacterial Genomic DNA Extraction Kit“ („Sigma-Aldrich“, Vokietija). Plazmidės DNR buvo išskirta naudojant „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva). Oligonukleotidų pradmenis susintetino „Metabion“ (Vokietija), o jų sekos pateiktos 2 lentelėje. Klonavimui skirta DNR buvo amplifikuota PGR metodu, naudojant „Phusion High-Fidelity DNA“ polimerazę („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva). Bakterijų kolonijų atranka buvo atlikta naudojant „DreamTaq Green PCR Master Mix“ („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva). Linearizuoti DNR fragmentai iš elektroforezės gelio buvo išskirti naudojant „Zymoclean Gel DNA Recovery Kit“ („Zymo Research“, JAV). Restrikcijos fermentai buvo įsigyti iš „Thermo Fisher Scientific“ (Lietuva). PGR reakcijos buvo atliktos pagal gamintojo protokolą. Kompetentinės *E. coli* TOP10 ir S17-1 ląstelės buvo paruoštos ir transformuotos šilumos šoko metodu (Sambrook and Russell 2001). *Sphingobium* sp. SYK-6 kompetentinės ląstelės buvo paruoštos ir transformuotos naudojant elektroporacijos metodą, kaip aprašyta (Masai, Katayama ir Fukuda, Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds 2007).

Plazmidžių konstravimas

Visos plazmidės buvo sukonstruotos naudojant NEBuilder HiFi DNR surinkimo metodą (New England Biolabs, JK). pBRC1 vektorius (Augustiniene and Malys 2022) buvo sukonstruotas, kaip aprašyta pEH006 (Hanko, Minton and Malys 2017). pAJ144 buvo aprašytas (Kasari, et al. 2022). pEA074 buvo sukonstruotas naudojant oligonukleotidų pradmenis EA322B ir EA323, siekiant amplifikuoti P_{SLG_25010} iš pEA056, ir klonuotas į pAJ144 vektorių naudojant XhoI ir EcoRI restrikcijos vietas. pEA056 buvo sukonstruotas naudojant oligonukleotidų pradmenis EA146 ir EA147, siekiant amplifikuoti P_{SLG_25010} iš *Sphingobium* sp. SYK-6 genomines DNR, ir klonuotas į pBRC1 vektorių naudojant AatII ir NdeI restrikcijos vietas. pEA072 buvo sukonstruotas naudojant oligonukleotidų pradmenis EA322B ir EA323, siekiant amplifikuoti tariamą siringo rūgšties indukuojamą sistemą iš pEA056_2, ir klonuotas į pAJ144 vektorių per XhoI ir EcoRI restrikcijos vietas. pEA056_2 buvo sukonstruotas naudojant oligonukleotidų pradmenų poras EA148 ir EA151A, EA320 ir EA321, EA147 ir EA150, siekiant amplifikuoti atitinkamai desX, P_{SLG_24900} ir P_{SLG_25010} iš *Sphingobium* sp. SYK-6 genomines DNR, ir klonuotas į pBRC1 vektorių per AatII ir NdeI restrikcijos vietas.

pLO3 buvo sukarpytas su SbfI ir SacI restrikcijos endonukleazėmis ir panaudotas kaip klonavimo vektorius plo3-KB1, plo3-DesX ir plo3-DesA konstravimui. Plazmidės plo3-KB1 konstravimui buvo panaudoti oligonukleotidų susintetinti pradmenys KB001 ir KB003, siekiant amplifikuoti *rfp* iš pBRC1, oligonukleotidų pradmenų poros KB004/KB005 ir KB007/KB008, siekiant amplifikuoti atitinkamai kairę ir dešinę homologines rankas iš *Sphingobium* sp. SYK-6 genomines DNR. Plazmidės plo3-DesX konstravimui buvo panaudotos oligonukleotidų pradmenų poros EG301_desX/EG302_desX ir EG303_desX/EG304_desX, siekiant amplifikuoti atitinkamai kairę ir dešinę homologijos rankas iš *Sphingobium* sp. SYK-6 genomines DNR. Plazmidės plo3-DesA konstravimui buvo panaudotos oligonukleotidų pradmenų poros EG305_desX/EG306_desX ir EG307_desX/EG308_desX, siekiant amplifikuoti atitinkamai kairę ir dešinę homologijos rankas iš *Sphingobium* sp. SYK-6 genomines DNR.

Genų išjungimas ir įterpimas į Sphingobium sp. SYK-6

pLO3 vektoriaus pagrindu sukurtos plazmidės (plo3-KB1, plo3-DesX ir plo3-DesA) buvo transformuotos į *E. coli* S17-1. *E. coli* S17-1 ir *Sphingobium* sp. SYK-6 arba jų mutantai buvo kultivuojami per naktį LB terpėje, papildytoje atitinkamais antibiotikais; *E. coli* S17-1 atveju kultūros terpė buvo papildyta 12,5 µg/ml tetraciklino, o SYK-6 atveju kultūros terpė buvo papildyta 12,5 µg/ml chloramfenikolio. Po inkubacijos ląstelės buvo surinktos centrifuguojant (5000 × g 4 min.) ir kelis kartus plaunamos LB terpe. *E. coli* S17-1 ir *Sphingobium* sp. SYK-6 ląstelės buvo praskiestos atitinkamai santykiu 1:1000 ir panaudotos konjugacijai LB agarą lėkštelėje 16 val. kambario temperatūroje. *Sphingobium* sp. SYK-6 transkonjugantai, gauti po pirmosios homologinės rekombinacijos, buvo išskirti pasėjant juos ant LB agarą plokštelių, papildytų 12,5 µg/ml tetraciklinu ir 12,5 µg/ml chloramfenikoliu. Gautos kolonijos buvo perskirstytos ant LB agarą terpės su 12,5 µg/ml tetraciklinu ir 12,5 µg/ml chloramfenikoliu ir atrinktos kolonijų PGR metodu, siekiant patvirtinti viengubą rekombinaciją. Pavienės kolonijos buvo inokuliuotos į 5 ml LB terpės, kurioje yra 10 % sacharozės. Mutantų kandidatės buvo išskirtos ant LB agarą plokštelės, kurioje yra 10 % sacharozės ir 12,5 µg/ml chloramfenikolio. Gautos kolonijos buvo perskirstytos ant LB agarą plokštelės su 12,5 µg/ml tetraciklinu ir kitos LB agarą plokštelės su 12,5 µg/ml chloramfenikoliu, siekiant patvirtinti pLO3 vektoriaus pagrindu sukurtos plazmidės praradimą. Atliktas kolonijų PGR tyrimas, siekiant patvirtinti dvigubą rekombinaciją.

RFP fluorescencijos matavimai

RFP fluorescencijos matavimai, absoliučios normalizuotos fluorescencijos ir dozės-atsako kreivių skaičiavimai atlikti, kaip aprašyta (Augustiniene, Kutraite, et al. 2023, Hanco, Minton and Malys 2019).

Sphingobium sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA* biojutiklio sekvenavimas

Sphingobium sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA* genomines DNR skaitymų žemėlapis sudarymas (sekvenavimas) pagal etaloninį *Sphingobium* sp. SYK-6 genomą.

3. Rezultatai ir diskusija

3.1 Plazmidžių pagrindu sukurtos reporterinės sistemos, reaguojančios į siringo rūgštį, sukūrimas ir įvertinimas

Ankstesniuose tyrimuose *Sphingobium* sp. SYK-6 kataboliniai keliai ir reguliavimo mechanizmai, susiję su siringo rūgšties skaidymu, buvo aprašyti (Masai, Katayama ir Fukuda 2007, Kamimura, Takahashi, et al. 2017), o už šį skaidymą atsakingas genų klasteris buvo identifikuotas (Araki, Umeda, et al. 2019, Araki, Tanatani, et al. 2020) (1A pav.). Šiame tyrime siekėme įvertinti *SpDesX/P_{SLG_25010}* indukuojamos genų ekspresijos sistemos atsaką į siringo rūgštį, naudodami plazmidėmis pagrįstą reporterinę sistemą. Buvo surinktos dvi konstrukcijos ir klonuoti į RFP reporterinį vektorių: pirmasis turėjo indukuojamą promotorių *P_{SLG_25010}* prieš *desA*, o antrasis – indukuojamus promotorius *P_{SLG_25010}* ir *P_{SLG_24900}* atitinkamai prieš *desA* ir *SLG_24900*, bei TF geną *desX* (1B pav.). Gautos konstrukcijos *SpP_{SLG_25010}* (pEA074) ir *SpDesX/P_{SLG_25010}* (pEA072) buvo išbandytos su *Sphingobium* sp. SYK-6 laukinio tipo (*wt*) ir Δ *desX* trūkumą turinčia mutantine paderme (Δ *desX*), esant siringo rūgščiai ir struktūriškai artimai giminingai vanilino rūgščiai (1C, D pav.). *Sphingobium* sp. SYK-6, turinti plazmidę pEA074, parodė iki 2,5 karto padidėjusią RFP sintezę praėjus 6 val. po 5 mM siringo rūgšties papildymo. 1,8 karto padidėjęs *rfp* geno ekspresijos aktyvumas taip pat buvo pastebėtas esant vanilino rūgščiai. *Sphingobium* sp. SYK-6 Δ *desX* trūkumą turinti mutantinė padermė, turinti pEA074 vektorių, neparodė reikšmingo aktyvavimo nei siringo, nei vanilino rūgštimis; tačiau absoliučios normalizuotos fluorescencijos vertės išliko padidėjusios, maždaug 5000 A.U. Šie rezultatai patvirtino, kad TF *desX* veikia kaip represorius, kontroliuojantis *desA* geno raišką, papildydamas Araki ir kt. pateiktus rezultatus (Araki, Tanatani, et al. 2020). Pateiktame tyrime taip pat buvo nustatyta *desA* promotoriaus vieta, tačiau *desX* promotoriaus regionas dar nebuvo nenustatytas. Mūsų tyrimas parodė, kad pEA072 konstrukcija, kurioje yra *P_{SLG_24900}* prieš *desX*, buvo indukuota siringo ir vanilino rūgštimis, tiek laukinio tipo, tiek *desX* neturinčiose

mutantinėse padermėse. Šie rezultatai patvirtino, kad tarpgeninis regionas prieš *SLG_24900* yra *desX* promotorius.

Be to, *ΔdesX* neturintis mutantas, turintis plazmidę pEA072, neindukuotame mėginyje parodė 1,5 karto didesnę absoliučiąją normalizuotą fluorescenciją nei tas pats konstruktas laukinio tipo kamiene (1C ir D pav.). *Sphingobium* sp. SYK-6 laukinio tipo kamienas, turintis plazmidę pEA072, turi dvi *desX* TF kopijas, vieną esančią genomineje DNR, o kitą –pEA072 plazmidėje. Dviejų *desX* kopijų buvimas gali sustiprinti *desA* represiją. Be to, *Sphingobium* sp. SYK-6, turintis plazmidę pEA072, parodė RFP sintezės padidėjimą iki 137,7 ir 68,2 karto, o *ΔdesX* mutantas – atitinkamai 37,0 ir 15,5 karto praėjus 6 val. po papildymo 5 mM siringo ir vanilo rūgštimis (1C ir D pav.). Pažymėtina, kad *E. coli* ląstelės, turinčios reporterinę konstrukciją su *SpDesX/P_{SLG_25010}* sistema, neparodė reikšmingo fluorescencijos padidėjimo esant siringo arba vanilo rūgštimis. Tai rodo, kad šios indukuojamos sistemos aktyvavimui *E. coli* reikalingas papildomas, *Sphingobium* sp. SYK-6 kilmės faktorius. Pavyzdžiui, struktūriniai skirtumai tarp *E. coli* ir *Sphingobium* sp. SYK-6 RNR polimerazės holofermentų, įskaitant sigma faktorius, gali lemti neefektyvų *P_{SLG_25010}* promotoriaus atpažinimą ir sutrikusią transkripcijos inicijavimą *E. coli* (Browning and Busby 2016).

3.2 Fluorescencinio reporterinio geno integravimas į *Sphingobium* sp. SYK-6 genomą siringo rūgšties aptikimui

Norint sukurti visos ląstelės biojutiklį siringo rūgšties aptikimui, homologinės rekombinacijos būdu pasroviui nuo *desA* geno į *Sphingobium* sp. SYK-6 ląsteles buvo įvestas pBRC1 plazmidėje esantis (Augustiniene and Malys 2022, Hanco, Minton and Malys 2017) RFP koduojantis genas (2A pav.). Gautas biojutiklis, pavadintas *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp*, buvo įvertintas pagal atsaką į siringo ir vanilo rūgštis. Logaritmiškai augančių ląstelių RFP fluorescencijos išeiga Wx-SEMP terpėje buvo matuojama praėjus 8 val. po 5 mM induktoriaus papildymo. *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* parodė atitinkamai 13 ir 10 kartų didesnę fluorescenciją esant siringo ir vanilo rūgštimis (2B pav.).

Siekiant dar labiau išaiškinti TR DesX vaidmenį kontroliuojant genų raišką, *desX* genas buvo pašalintas *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* kamiene (2A pav.). Gautas *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesX* kamienas neindukuojančiomis sąlygomis parodė 55 kartus didesnę fluorescenciją, palyginti su *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* paderme (2B pav.). Šie rezultatai papildė aukščiau ir (Araki, Tanatani, et al. 2020) straipsnyje pateiktus duomenis, patvirtindami, kad DesX veikia kaip transkripcijos represorius ir kad nuo DesX priklausoma genų raiška yra aktyvuojama esant arba siringo, arba vanilo rūgštimis.

3.3 *Sphingobium* sp. SYK-6 pagrindu sukurto biojutiklio tobulinimas ir įvertinimas

Siekiant nustatyti, ar *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* biojutiklį galima patobulinti ištrynus *desA* geną, buvo sukonstruotas kamienas, turintis *rfp* reporterį ir neturinti šio geno, biojutiklis pavadintas *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA* (3A pav.). *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* biojutiklio sekvenavimo rezultatai patvirtino, *desA* geno deleciją (5 pav.). Biojutikliai *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* ir *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA* fluorescencijos matavimai atlikti Wx-SEMP terpėje, papildytoje siringo ir vanilino rūgštimis. Absoliučios normalizuotos fluorescencijos vertės parodė padidėjimą nuo 13 iki 17 kartų (3B, E ir G pav.) su *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA*, lyginant su *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp*, praėjus 8 val. po siringo rūgšties pridėjimo iki 5 mM galutinės koncentracijos. Taip pat pastebėtas dinaminių diapazonų padidėjimas nuo 9 iki 12 kartų (1 lentelė). Tuo tarpu *desA* delecija nepadidino biojutiklio atsako į vanilino rūgštį nei indukcijos kartų (3B pav.), nei dinaminio diapazono (1 lentelė).

Dozės ir atsako santykis tarp užlašteliniu būdu pridėtos siringo arba vanilino rūgšties koncentracijos ir fluorescencijos išvesties buvo tiriamas naudojant abu biojutiklius – *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* ir *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA* (3C ir D pav.). *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA* parodė 22 kartus mažesnę *Km* vertę su siringo rūgštimi, lyginant su *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp*, bet abu biojutikliai parodė panašias *Km* vertes su vanilino rūgštimi (1 lentelė, 3C ir D pav.). *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* dozės ir atsako kreivė parodė, kad genų raiška gali būti stebima nuo 39 μ M iki 5 mM diapazone, reaguojant į siringo rūgštį. Palyginimui, *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA* biojutiklis pasižymėjo veikimo diapazonu esant žymiai mažesnėms koncentracijoms – nuo 2,4 μ M iki 0,625 mM. Be to, *desA* ištrynimasis sukėlė nedidelį, bet išmatuojamą veikimo diapazono poslinkį, sumažindamas jį nuo 0,625–5 mM iki 0,3125–2,5 mM, naudojant vanilino rūgštį (1 lentelė, 3D pav.). Šis veikimo diapazono sumažėjimas greičiausiai susijęs su tuo, kad vanilino rūgštis, veikia kaip DesA substratas (Masai, Katayama ir Fukuda 2007, Abe, et al. 2005).

Augimo kreivės parodė, kad *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* rodo padidėjusį augimą pridėjus ir siringo, ir vanilino rūgšties (3F pav.). *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp* Δ *desA* biojutiklis parodė panašų augimą kaip ir *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfp*, esant vanilino rūgščiai, tačiau siringo rūgšties pridėjimas augimo nepagerino, jis išliko panašus į kontrolinį (3H pav.). Šie rezultatai rodo, kad *desA* geno ištrynimasis panaikino siringo rūgšties skaidymą (3H pav.) ir lėmė siringato kaupimąsi ląstelėse, o tai greičiausiai lėmė padidėjusią genų raiškos derepresiją dėl efektyvesnio DesX išskyrimo iš genomines DNR (3G pav.).

3.4 Fenolinių junginių metabolizmo *Sphingobium* sp. SYK-6 išaiškinimas, parametrizuojant *Sphingobium* sp. SYK-6 pagrindu veikiančią viso ląstelės biojutiklį

Sphingobium sp. SYK-6 gali paversti ferulatą vanilatu, naudodamas *ferA* ir *ferB* genus, kurie koduoja atitinkamai feruloil-KoA sintetazės ir feruloil-KoA hidratazės/liazės fermentus (5A pav.) (Masai, Harada, et al. 2002). Mes iškėlėme hipotezę, kad *ferAB* koduojantys fermentai taip pat gali paversti sinapatą siringatu, kaip aprašyta *N. aromaticivorans* DSM12444 (Cecil, et al. 2018) (4A pav.). Feruloil-CoA sintetazės aktyvumas ferulato, kaip substrato, atžvilgiu anksčiau buvo parodytas (Masai, Harada, et al. 2002, Kasai, et al. 2012), tačiau sinapato skaidymo tarpinis produktas *Sphingobium* sp. SYK-6 iki šiol nebuvo patvirtintas ar aprašytas. Mes samprotavome, kad šiame darbe sukurtas biojutiklis galėtų būti naudojamas vanilato ir siringato skaidymo takų metabolitams, įskaitant vaniliną ir siringaldehidą, aptikti ir kiekybiškai įvertinti.

Šiame darbe buvo išbandytas *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA* biojutiklis su skirtingomis sinapo ir siringo rūgščių koncentracijomis nuo 0 iki 0,3125 mM ir ferulo bei vanilo rūgštimis nuo 0 iki 5 mM. 4B paveiksle ir 2 lentelėje pateiktos dozės ir atsako kreivės bei atitinkami biojutiklio parametrai, išmatuoti praėjus 8 valandoms po atitinkamų fenolinių rūgščių pridėjimo. *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA* biojutiklis parodė kelis kartus didesnę dinaminę diapazoną su sinapatu ir siringatu nei su ferulatu ir vanilatu. Biojutiklio dozės ir atsako kreivės parodė atsako diapazoną atitinkamai nuo 0,078 iki 5 mM ir nuo 0,3125 iki 2,5 mM su ferulatu ir vanilatu, o sinapatui ir siringatui atsakas buvo stebimas atitinkamai nuo 9,7 iki 78 μmol ir nuo 2,4 iki 78 μmol. *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA* biojutiklis gali aptikti μmol lygio sinapo ir siringo rūgščių koncentracijas ir pademonstravo *K_m* vertes, atitinkamai lygias 9,7 ir 2,4 μmol. 4C pav. parodyta, kad *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA* biojutiklis rodo 1,22 μmol siringo rūgšties aptikimo riba.

Šis biojutiklis taip pat buvo išbandytas su sinapato ir ferulato katabolizmo tarpiniais produktais – siringaldehidu ir vanilinu (4D pav.). RFP fluorescencijos išvestis parodė, kad siringaldehidas ir vanilinas atitinkamai paverčiami siringatu ir vanilatu, tarpininkaujant 8 ir 2 kartus aktyvinant reporterio geno ekspresiją. Vėliau indukcijos kinetika (4E–J pav.), indukcijos pasikartojimas (4D pav.) ir dozės ir atsako duomenys (4B pav.), kartu su kelio analize ir ankstesnėmis ataskaitomis, rodo, kad sinapatas SYK-6 yra paverčiamas siringatu per siringaldehidą kaip tarpinį produktą. Nors šiame tyrime siringaldehidas nebuvo tiesiogiai aptiktas, jo, kaip tarpinio produkto sinapato katabolizme bakterijose, vaidmuo jau buvo anksčiau aprašytas (Cecil, et al. 2018, Kamimura, Goto, et al. 2017). Pažymėtina, kad

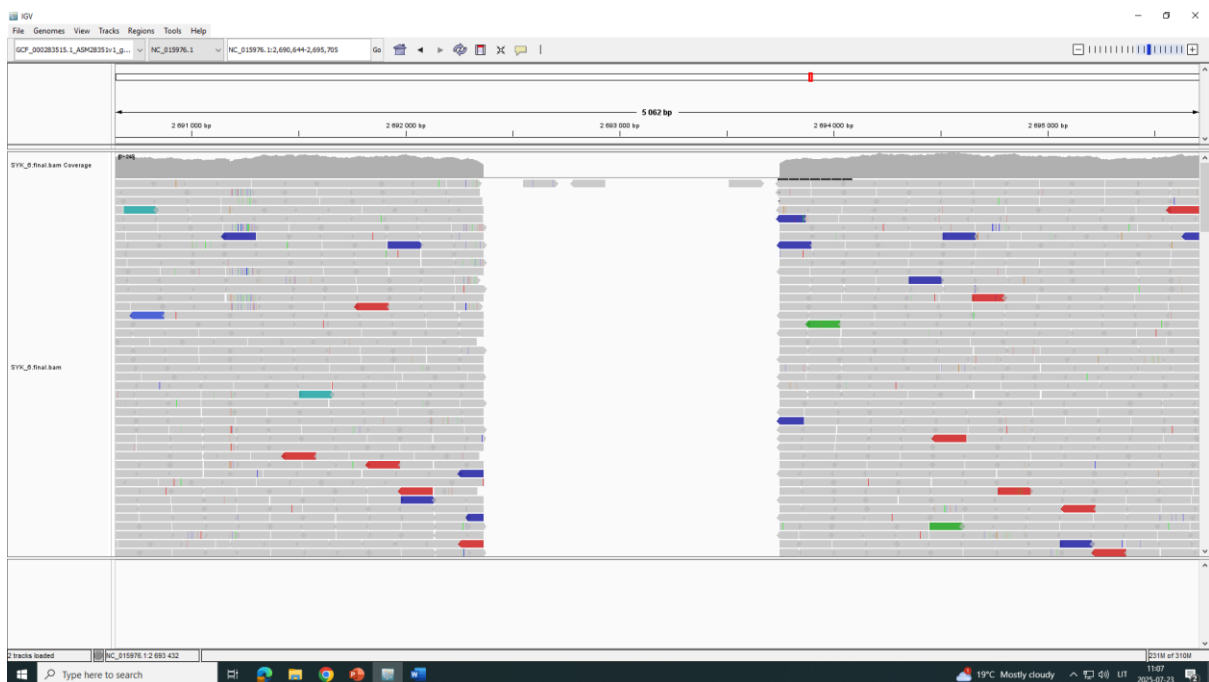
biojutiklis parodė panašius indukcijos lygius (1000–2000 vienetų), reaguodamas į sinapatą, siringadehidą ir siringatą, o tai dar labiau patvirtina jų nuoseklų ryšį skaidymo kelyje.

Organinės anglies šaltinių panaudojimas ir pirmenybė teikiama jų pasisavinimui buvo išsamiai tirti tokiuose modeliniuose mikroorganizmuose kaip *E. coli* (Fox and Prather 2020), *B. subtilis* (Stulke 2000), *P. aeruginosa* ir *P. putida* (Park, et al. 2020). Pavyzdžiui, anglies katabolinė represijos analizė parodė, kad *E. coli* ir *B. subtilis* pirmiausia katabolizuoja gliukozę, o *P. aeruginosa* ir *P. putida* – organines rūgštis ir aminorūgštis (Fox and Prather 2020, Stulke 2000, Park, et al. 2020). Nors žinoma, kad *Sphingobium* sp. SYK-6 kaip anglies šaltinius naudoja fenolio rūgštis (Kamimura, Takahashi, et al. 2017), informacija apie jos pirmenybę teikiančių skirtingų fenolio rūgščių pasisavinimą lieka ribota. Ankstesnė srauto analizė parodė, kad *Sphingobium* sp. SYK-6 pirmenybę teikia fenolio junginiams, tokiems kaip vanilino rūgštis arba vanilinas, palyginti su kitais organiniais substratais (Varman, et al. 2016), tačiau išsamesnės informacijos apie šį metabolinį pasirinkimą lieka nedaug.

Mes iškėlėme hipotezę, kad *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA* biojutiklis gali būti naudojamas tiriant preferencinę fenolinių junginių pasisavinimo strategiją *Sphingobium* sp. SYK-6 ląstelėse. *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA* buvo auginamos su skirtingomis fenolinėmis rūgštimis ir jų mišiniais Wx-SEMP terpėje, o RFP fluorescencijos ir absorbcijos išvestys buvo nustatytos laikui bėgant (4E–J pav.). Absoliučios normalizuotos fluorescencijos kreivės parodė reikšmingą fluorescencijos sumažėjimą mėginiuose, kuriuose buvo siringato ir vanilato arba sinapato ir ferulato mišiniai, palyginti su mėginiais, kuriuose buvo tik siringatas arba sinapatas (4E ir F pav.). Be to, fluorescencija buvo maždaug 500 vienetų mažesnė po 8 valandų, kai į terpę buvo įdėta siringato ir protokatechuato mišinio, palyginti su vien tik siringatu (4G pav.). Augimo kreivės rodė padidėjusį bakterijų augimą terpėse, papildytose vanilatu, ferulatu arba protokatechuta, o tai rodo, kad šie substratai labiau pasisavinami nei siringatas ir sinapatas (4H–J pav.). Be to, duomenys taip pat rodo, kad vanilatas ir siringatas konkuruoja dėl prisijungimo prie DesX. Šis stebėjimas atitinka Araki ir kt. išvadas, kurie parodė, kad DesX atpažįsta ir vanilatą, ir siringatą kaip efektorines molekules, pasižyminčias didesniu afinitetu siringato rūgščiai nei vanilino rūgščiai (Araki, Tanatani, et al. 2020), šią tendenciją patvirtina ir mūsų rezultatai (3B pav.).

Iki šiol *Sphingobium* sp. SYK-6 apibūdinti tik keli transporteriai, dalyvaujantys fenolinių rūgščių įsisavinime (Fujita, et al. 2021, Mori, Kamimura and Masai 2018). Protokatechuato transporterio genas *pcaK* gali pernešti protokatechuatą, vanilatą, siringatą, 4-hidroksibenzoatą ir 3-hidroksibenzoatą. Be to, šis tyrimas parodė, kad protokatechuatas slopina

pcaK transporterio ekspresiją, o vanilato transporterio geno ekspresija yra indukuojama vanilato katabolizmo metu (Mori, Kamimura and Masai 2018). Šie rezultatai rodo, kad vanilino rūgšties įsisavinime gali dalyvauti kiti transporteriai, nors tokie transporteriai dar nebuvo apibūdinti *Sphingobium* sp. SYK-6 (Fujita, et al. 2021). Be to, Mori ir kt. tyrimas parodė, kad protokatechuato buvimas terpėje sumažina vanilato ir siringato įsisavinimą. Panašiai nustatyta, kad terpėje esantis vanilatas sumažina tiek siringato, tiek protokatechuato (Mori, Kamimura and Masai 2018) pasisavinimą. Mūsų rezultatai atitinka šiuos rezultatus: su siringatu stebėtas fluorescencijos signalas sumažėjo, kai buvo pridėtas siringato ir vanilato mišinys (4E pav.). Be to, su mišiniu stebėtas augimo profilis buvo panašus į tą, kuris buvo stebimas su vien vanilino rūgštimi, o tai rodo, kad vanilatas gali trukdyti siringato rūgšties pasisavinimui (4H pav.). Kadangi duomenys apie hidrokscinamono rūgščių pasisavinimą lieka neišsamūs, šiame tyrime sukurtas biojutiklis galėtų būti naudojamas pasisavinimo trukdžiams matuoti arba fenolinių junginių pernašos hierarchijai nustatyti.



5 pav. *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA* biojutiklio sekvenavimo rezultatai.

4. Išvados

Visų ląstelių biojutikliai siūlo perspektyvias priemones fenolio rūgščių pasisavinimui ląstelėse stebėti. Susieję transkripcijos atsako elementą su reporteriniu genu, tokie biojutikliai paverčia fenolio junginių kaupimąsi ląstelėse į kiekybiškai įvertinamą rezultatą. Šiame tyrime pademonstravome „*Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA*“ biojutiklį, skirtą siringatui ir vanilatui,

konstrukciją, kuris taip pat gali būti naudojamas jų priešsrovinio kelio metabolitams, tokiems kaip sinapatas ir ferulatas, aptikti (5 pav.). Mūsų žiniomis, genetiškai užkoduotas siringo rūgšties biojutiklis dar nėra sukurtas. Mūsų biojutiklis suteikia naują ir patikimą platformą siringo rūgščiai – pagrindiniam lignino kilmės junginiui – aptikti, kuri gali būti vertinga priemonė pramoniniam pritaikymui. Svarbu tai, kad „*Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA*“ biojutiklis aptinka platesnį substratų spektrą, padidindamas jo potencialų naudingumą stebint įvairius tarpinius produktus lignino ir aromatinių junginių skaidymo keliuose. Šis biojutiklis leidžia analizuoti hidrokisicinamoninių rūgščių įsisavinimą, įskaitant interferencinius efektus ir substratų hierarchiją tarp fenolinių junginių. Be to, *Sphingobium* sp. SYK-6-*rfpΔdesA* gali būti naudojama kaip platforma kuriant labiau specializuotas biojutiklių versijas, ištrinant genus, dalyvaujančius priešsrovinio kelio tarpinių junginių formavime.

Šiame darbe buvo patvirtinta, kad sfingomonadų grupės bakterijos gali būti genetiškai modifikuotos stabiliai ekspresuoti fluorescuojantį baltymą, o pasirinktų promotorių pagalba įmanoma sukurti biojutiklinę sistemą, jautriai reaguojančią į aromatinius teršalus. Sukurtos konstruotos bakterijos demonstravo tiek gebėjimą nustatyti tikslinius junginius fluorescencijos pokyčiais, tiek išlaikė bioremediacinius gebėjimus, nepažeidžiant augimo ar metabolinio aktyvumo. Gauti rezultatai pagrindžia šio metodo potencialą kurti pažangias mikrobines bioremediacijos sistemas, pritaikomas aplinkos taršos monitoringui ir šalinimui.

Rezultatų panaudojamumas:

Gauti rezultatai naudoti rengiant publikaciją pavadinimu „Integration of the fluorescent reporter into *Sphingobium* sp. SYK-6 genome enables development of biosensor for detection of syringic acid“, kuris šiuo metu yra įteiktas į ACS Synthetic Biology (Q1 IF 3.9) žurnalą.

Patikrinta ir pasitvirtinusi mokslinė idėja prisidės prie planuojamų rengti mokslinių projektų paraiškų, įskaitant paraiškas dalyvavimui Europos Sąjungos mokslinių tyrimų ir inovacijų programos „Europos horizontas“ kvietimuose.

Gauti rezultatai taip pat turi reikšmingą pritaikomąją vertę biotechnologijose ir biojutiklių kūrimo. Sukurtas metodas, leidžia įterpti ir fluorescuojantį baltymą sfingomonadų grupės bakterijose, atveria kelią plačiam taikymui:

1. Aplinkos taršos monitoringui;
2. Bioremediacijos procesų optimizavimui;
3. Modulinės biosintetinės platformos kūrimui.

Projekto vadovė

Ernesta Augustinienė



**Finansuoja
Europos Sąjunga**
NextGenerationEU



**NAUJOS KARTOS
LIETUVA**

Finansuoja Europos Sąjunga NextGenerationEU

Naudoti literatūros šaltiniai

- Abe, Tomokuni, Eiji Masai, Keisuke Miyauchi, and Yoshihiro Katayama. 2005. "A tetrahydrofolate-dependent O-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6." *J. Bacteriol.* 187 (6). doi:10.1128/jb.187.6.2030-2037.2005.
- Al Farraj, Dunia A., Roua M. Alkufeidy, Noorah A. Alkubaisi, and Maryam K. Alshammari. 2021. "Polynuclear aromatic anthracene biodegradation by psychrophilic *Sphingomonas* sp., cultivated with tween-80." *Chemosphere* 2021: 128115. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128115.
- Araki, Takuma, Kenta Tanatani, Naofumi Kamimura, Yuichiro Otsuka, Muneyoshi Yamaguchi, Masaya Nakamura, and Eiji Masai. 2020. "The syringate o-demethylase gene of *Sphingobium* sp. strain SYK-6 is regulated by DesX, while other vanillate and syringate catabolism genes are regulated by DesR." *Appl. Environ. Microbiol.* 86 (22): e01712-20. doi:10.1128/AEM.01712-20.
- Araki, Takuma, Shusuke Umeda, Naofumi Kamimura, Daisuke Kasai, Shuta Kumano, Tomokuni Abe, Chika Kawazu, et al. 2019. "Regulation of vanillate and syringate catabolism by a MarR-type transcriptional regulator DesR in *Sphingobium* sp. SYK-6." *Sci. Rep.* 9 (1): 18036. doi:10.1038/s41598-019-54490-7.
- Asaf, Sajjad, Muhammad Numan, Abdul Latif Khan, and Ahmed Al-Harrasi. 2020. "Sphingomonas: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth." *Crit. Rev. Biotechnol.* 40 (2): 138-152. doi:10.1080/07388551.2019.1709793.
- Augustiniene, Ernesta, and Naglis Malys. 2022. "Identification and characterization of L- and D-lactate-inducible systems from *Escherichia coli* MG1655, *Cupriavidus necator* H16 and *Pseudomonas* species." *Sci. Rep.* 12: 2123. doi:10.1038/s41598-022-06028-7.
- Augustiniene, Ernesta, Ingrida Kutraite, Egle Valanciene, Paulius Matulis, Ilona Jonuskiene, and Naglis Malys. 2023. "Transcription factor-based biosensors for detection of naturally occurring phenolic acids." *N Biotechnol.* 78: 1-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.09.004.
- Augustiniene, Ernesta, Ingrida Kutraite, Egle Valanciene, Paulius Matulis, Ilona Jonuskiene, ir Naglis Malys. 2023. „Transcription factor-based biosensors for detection of naturally occurring phenolic acids.“ *New Biotechnology* 78: 1-12.
- Bleem, Alissa, Ryo Kato, Zoe A. Kellermeyer, Rui Katahira, Masahiro Miyamoto, Koh Niinuma, Naofumi Kamimura, Eiji Masai, and Gregg T. Beckham. 2023. "Multiplexed fitness profiling by RB-TnSeq elucidates pathways for lignin-related aromatic catabolism in *Sphingobium* sp. SYK-6." *Cell Rep.* 42 (8): 112847. doi:10.1016/j.celrep.2023.112847.

- Brecht, De Paepe, and De Mey Marjan. 2025. "Biological switches: past and future milestones of transcription factor-based biosensors." *ACS Synth. Biol.* 14 (1): 72-86. doi:10.1021/acssynbio.4c00689.
- Browning, Douglas F., and Stephen J. W Busby. 2016. "Local and global regulation of transcription initiation in bacteria." *Nat. Rev. Microbiol.*, 638–650. doi:10.1038/nrmicro.2016.103.
- Cecil, Jacob H., David C. Garcia, Richard J. Giannone, and Joshua K. Michener. 2018. "Rapid, parallel identification of catabolism pathways of lignin-derived aromatic compounds in *Novosphingobium aromaticivorans*." *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (22): e01185-18. doi:10.1128/AEM.01185-18.
- Cheemanapalli, Srinivasulu, Ramgopal Mopuri, Ramanjaneyulu Golla, Anuradha C.M., and Suresh Kumar Chitta. 2018. "Syringic acid (SA) – a review of its occurrence, biosynthesis, pharmacological and industrial importance." *Biomed. Pharmacother.* 108: 547-557. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.069.
- de Faria, Emanuelle L. P., Ana M. Ferreira, Ana Filipa M. Cláudio, João A. P. Coutinho, Armando J. D. Silvestre, and Mara G. Freire. 2019. "Recovery of syringic acid from industrial food waste with aqueous solutions of ionic liquids." *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7 (16): 14143–14152. doi:10.1021/acssuschemeng.9b02808.
- Dinh, Mai Thi Ngoc, Van Thi Nguyen, and Ly Thi Huong Nguyen. 2023. "The potential application of carbazole-degrading bacteria for dioxin bioremediation." *Bioresour. Bioprocess.* 10 (1): 56. doi:10.1186/s40643-023-00680-1.
- Flood, Jake J., and Shelley D. Copley. 2018. "Genome-wide analysis of transcriptional changes and genes that contribute to fitness during degradation of the anthropogenic pollutant pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum*." *mSystems* 3 (6): e00275-18. doi:10.1128/MSYSTEMS.00275-18.
- Fox, Kevin J, and Kristala LJ Prather. 2020. "Carbon catabolite repression relaxation in *Escherichia coli*: global and sugar-specific methods for glucose and secondary sugar co-utilization." *Curr. Opin. Chem. Eng.* 30: 9-16. doi:10.1016/j.coche.2020.05.005.
- Fujita, Masaya, Shodai Yano, Koki Shibata, Mizuki Kondo, Shojiro Hishiyama, Naofumi Kamimura, and Eiji Masai. 2021. "Functional roles of multiple Ton complex genes in a *Sphingobium* degrader of lignin-derived aromatic compounds." *Sci. Rep.* 11: 22444. doi:10.1038/s41598-021-01756-8.
- Gomes da Silva, Aline Priscilla, William Gustavo Sganzerla, Oliver Dean John, and Rogério Marchiosi. 2025. "A comprehensive review of the classification, sources, biosynthesis, and biological properties of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids." *Phytochem. Rev.* 24: 1061–1090. doi:10.1007/s11101-023-09891-y.
- Ha, Su Jeong, Jangho Lee, Joon Park, Young Ho Kim, Nam Hyouck Lee, Young Eon Kim, Kyung-Mo Song, Pahn-Shick Chang, Chul-Ho Jeong, and Sung Keun Jung. 2018. "Syringic acid prevents skin carcinogenesis via regulation of NoX and EGFR signaling." *Biochem. Pharmacol.* 154: 435-445. doi:10.1016/j.bcp.2018.06.007.

- Hanko, E.K.R., N.P. Minton, and N. Malys. 2019. "Design, cloning and characterization of transcription factor-based inducible gene expression systems." *Meth. Enzymol.* 621: 153-169.
- Hanko, Erik K. R., Nigel P. Minton, and Naglis Malys. 2017. "Characterisation of a 3-hydroxypropionic acid-inducible system from *Pseudomonas putida* for orthogonal gene expression control in *Escherichia coli* and *Cupriavidus necator*." *Sci. Rep.* 7: 1724. doi:10.1038/s41598-017-01850-w.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2018. *DDT, Lindane, and 2,4-D*. Vol. 113. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Yu, Yuanyuan, Wantang Huang, Wenyan Yu, Shaoyu Tang, and Hua Yin. 2023. "Metagenomic insights into the mechanisms of triphenyl phosphate degradation by bioaugmentation with *Sphingopyxis* sp. GY." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 263: 115261. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.115261.
- Jesus, Barbara C., Blanca Saenz de Miera, Ruben Santiago, Alice Martins, Rui Pedrosa, Maria Gonzalez-Miquel, and Isabel M. Marrucho. 2023. "Valorisation of *Sargassum muticum* through the extraction of phenolic compounds using eutectic solvents and intensification techniques." *RSC Sustain.* 1 (5): 1245 - 1258. doi:10.1039/d3su00051f.
- Jiang, Bo, Yating Chen, Yi Xing, Luning Lian, Yaixin Shen, Baogang Zhang, Han Zhang, et al. 2022. "Negative correlations between cultivable and active-yet-uncultivable pyrene degraders explain the postponed bioaugmentation." *J. Hazard. Mater.* 423: 127189. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127189.
- Jung, Ji Young, Hye Kyeoung Kang, Dae Won Jeong, Hyun Mi Jin, Byung-Gon Ryu, Bok Yeon Jo, Eu Jin Chung, and Sang-Soo Han. 2021. "Complete genome sequence of bisphenol a-degrading bacterium *Sphingobium* sp. Strain A3, isolated from contaminated soil." *Microbiology Resource Announcements* 10 (1): e0108820. doi:10.1128/MRA.01088-20.
- Kamimura, Naofumi, Kazuhiro Takamura, Hirofumi Hara, Daisuke Kasai, Ryo Natsume, Toshiya Senda, Yoshihiro Katayama, Masao Fukuda, and Eiji Masai. 2010. "Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism." *Journal of Bacteriology* 192 (13): 3394-33405. doi:10.1128/JB.00215-10.
- Kamimura, Naofumi, Kenji Takahashi, Kosuke Mori, Takuma Araki, Masaya Fujita, Yudai Higuchi, and Eiji Masai. 2017. "Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade: Update on bacterial lignin catabolism." *Environ. Microbiol. Rep.* 9 (6): 679-705. doi:10.1111/1758-2229.12597.
- Kamimura, Naofumi, Takayuki Goto, Kenji Takahashi, Daisuke Kasai, Yuichiro Otsuka, Masaya Nakamura, Yoshihiro Katayama, Masao Fukuda, ir Eiji Masai. 2017. „A bacterial aromatic aldehyde dehydrogenase critical for the efficient catabolism of syringaldehyde.“ *Sci. Rep.* 7 (44422). doi:https://doi.org/10.1038/srep44422.
- Kasai, Daisuke, Naofumi Kamimura, Kenta Tani, Shusuke Umeda, Tomokuni Abe, Masao Fukuda, and Eiji Masai. 2012. "Characterization of FerC, a MarR-type transcriptional

- regulator, involved in transcriptional regulation of the ferulate catabolic operon in *Sphingobium* sp. strain SYK-6." *FEMS Microbiol. Lett.* 332 (1): 68-75. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02576.x.
- Kasari, Marje, Villu Kasari, Mirjam Kärmas, and Arvi Jõers. 2022. "Decoupling growth and production by removing the origin of replication from a bacterial chromosome." *ACS Synth. Biol.*, 2610–2622. doi:https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00618.
- Kato, Ryo, Eugene Kuatsjah, Masaya Fujita, Alissa C. Bleem, Shojiro Hishiyama, Rui Katahira, Toshiya Senda, Gregg T. Beckham, Naofumi Kamimura, and Eiji Masai. 2025. "Metabolic modification of *Sphingobium lignivorans* SYK-6 for lignin valorization through the discovery of an unusual transcriptional repressor of lignin-derived dimer catabolism." *Green Chem.*, 1540–1555. doi:10.1039/d4gc05328a.
- Kim, N.M., R.W. Sinnott, and N.R. Sandoval. 2020. "Transcription factor-based biosensors and inducible systems in non-model bacteria: current progress and future directions." *Curr. Opin. Biotechnol.* 64: 39-46.
- Kutraite, Ingrida, and Naglis Malys. 2023. "Development and application of whole-cell biosensors for the detection of gallic acid." *ACS Synthetic Biology* 12 (2): 533–543. doi:10.1021/acssynbio.2c00537.
- Kutraite, Ingrida, Ernesta Augustiniene, and Naglis Malys. 2025. "Hydroxybenzoic acids: Microbial metabolism, pathway engineering and products." *Biotechnol. Adv.* 81: 108571. doi:10.1016/j.biotechadv.2025.108571.
- Kutraite, Ingrida, Ernesta Augustiniene, and Naglis Malys. 2024. "Maleylpyruvic acid-inducible gene expression system and its application for the development of gentisic acid biosensors." *Anal. Chem.* 96 (47): 18727–18735. doi:10.1021/acs.analchem.4c03906.
- Larke-Mejía, Nasmille L., Ornella Carrión, Andrew T. Crombie, Terry J. McGenity, and J. Colin Murrell. 2020. "Sphingopyxis sp. Strain OPL5, an isoprene-degrading bacterium from the sphingomonadaceae family isolated from oil palm leaves." *Microorganisms* 8 (10): 1-16. doi:10.3390/microorganisms8101557.
- Lee, Soo Yeon, Yun-Yeong Lee, and Kyung-Suk Cho. 2023. "Effect of *Novosphingobium* sp. CuT1 inoculation on the rhizoremediation of heavy metal- and diesel-contaminated soil planted with tall fescue." *Environmental Science and Pollution Research* 30 (6): 16612-16625. doi:10.1007/s11356-022-23339-4.
- Li, Na, Qian Peng, Li Yao, Qin He, Jiguo Qiu, Hui Cao, Jian He, Qihong Niu, Yunfeng Lu, ir Fengli Hui. 2020. „Roles of the gentisate 1,2-dioxygenases DsmD and GtdA in the catabolism of the herbicide dicamba in *Rhizorhabdus dicambivorans* Ndbn-20.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68 (35): 9287-9298.
- Li, Tao, Jia Xu, Amy L. Brower, Zhi-Jing Xu, Ying Xu, Jim C. Spain, and Ning-Yi Zhou. 2023. "Molecular basis and evolutionary origin of 1-nitronaphthalene catabolism in *Sphingobium* sp. strain JS3065." *Appl. Environ. Microbiol.* 89 (1). doi:10.1128/aem.01728-22.

- Mahbub, Khandaker Rayhan, Kannan Krishnan, Mallavarapu Megharaj, and Ravi Naidu. 2016. "Bioremediation potential of a highly mercury resistant bacterial strain *Sphingobium* SA2 isolated from contaminated soil." *Chemosphere* 144: 330-337. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.061.
- Masai, Eiji, Yoshihiro Katayama, and Masao Fukuda. 2007. „Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds.“ *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (1): 1-15. doi:https://doi.org/10.1271/bbb.60437.
- Masai, Eiji, Kyo Harada, Xue Peng, Hirotaka Kitayama, Yoshihiro Katayama, and Masao Fukuda. 2002. "Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6." *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (9): 4416-4424. doi:10.1128/AEM.68.9.4416-4424.2002.
- Minich, Andrej, Zdenko Levarski, Mária Mikulášová, Marek Straka, Adriána Liptáková, and Stanislav Stuchlík. 2022. "Complex analysis of vanillin and syringic acid as natural antimicrobial agents against *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Int. J. Mol. Sci.* 23 (3): 1816. doi:10.3390/ijms23031816.
- Mitchler, M.M., J.M. Garcia, N.E. Montero, and G.J. Williams. 2021. „Transcription factor-based biosensors: a molecular-guided approach for natural product engineering.“ *Curr. Opin. Biotechnol.* 69: 172-181.
- Mori, Kosuke, Naofumi Kamimura, and Eiji Masai. 2018. "Identification of the protocatechuate transporter gene in *Sphingobium* sp. strain SYK-6 and effects of overexpression on production of a value-added metabolite." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 4807–4816. doi:10.1007/s00253-018-8988-3.
- Mukherjee, Gargi, Ashish Sachan, Shashwati Ghosh, and Adinpunya Mitra. 2006. „Conversion of sinapic acid to syringic acid by a filamentous fungus *Paecilomyces variotii*.“ *J. Gen. Appl. Microbiol.* 52 (2): 131-135. doi:https://doi.org/10.2323/jgam.52.131.
- Mutter, Thamer Y., and Gerben J. Zylstra. 2021. "Differential roles of three different upper pathway meta ring cleavage product hydrolases in the degradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran by *Sphingomonas wittichii* Strain RW1." *Appl. Environ. Microbiol.* 87 (22): e01067-21. doi:10.1128/AEM.01067-21.
- Nagata, Yuji, Shunsuke Natsui, Ryo Endo, Yoshiyuki Ohtsubo, Natsuko Ichikawa, Akiho Ankai, Akio Oguchi, Shigehiro Fukui, Nobuyuki Fujita, and Masataka Tsuda. 2011. "Genomic organization and genomic structural rearrangements of *Sphingobium japonicum* UT26, an archetypal γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium." *Enzyme and Microbial Technology* 49 (6-7): 499-508. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.10.005.
- Nunes, Karine Campos, Danielle Lazarin-Bidoia, Tânia Ueda-Nakamura, Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager, Raphaël Michel, Rachel Auzély-Velty, and Celso Vataru Nakamura. 2025. "Syringic acid protective role: Combatting oxidative stress induced by UVB radiation in L-929 fibroblasts." *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 113104. doi:10.1016/j.jphotobiol.2025.113104.

- Park, Heejoon, S. Lee McGill, Adrienne D. Arnold, and Ross P Carlson. 2020. "Pseudomonad reverse carbon catabolite repression, interspecies metabolite exchange, and consortial division of labor." *Cell. Mol. Life Sci.* 77: 395–413. doi:10.1007/s00018-019-03377-x.
- Sambrook, J.F., and D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed., Vols 1,2 and 3*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sharma, Monika, Durgesh Narain Singh, Rohit Budhraj, Utkarsh Sood, Charu Dogra Rawat, Lorenz Adrian, Hans-Hermann Richnow, Yogendra Singh, Ram Krishan Negi, and Rup Lal. 2021. "Comparative proteomics unravelled the hexachlorocyclohexane (HCH) isomers specific responses in an archetypical HCH degrading bacterium *Sphingobium indicum* B90A." *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28 (30): 41380-41395. doi:10.1007/s11356-021-13073-8.
- Shi, Chao, Zhiwei Zheng, Xiaorong Zhang, Kaikuo Song, Zhenyu Jia, Yifei Chen, Miaochun Yang, Xin Liu, Rui Dong, and Xiaodong Xia. 2016. "Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobacter sakazakii* and its effect on cell membrane." *Food Chem.* 197 (A): 100-106. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.100.
- Singh, Abhishek, Anand Kumar Pandey, and Kumar Dubey. 2023. "Genome sequencing and in silico analysis of isoprene degrading monooxygenase enzymes of *Sphingobium* sp. BHU LFT2." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 41 (9): 3821-3834. doi:10.1080/07391102.2022.2057360.
- Song, Da, Xingjuan Chen, and Meiyong Xu. 2022. "Characteristics and functional analysis of the secondary chromosome and plasmids in sphingomonad." *Int. Biodeterior. Biodegradation* 171: 105402. doi:10.1016/j.ibiod.2022.105402.
- Stulke, J., Hillen, W. 2000. "Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species." *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 849–880. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.849.
- Tapia-Quirós, Paulina, Mercè Granados, Sonia Sentellas, and Javier Saurina. 2024. "Microwave-assisted extraction with natural deep eutectic solvents for polyphenol recovery from agrifood waste: Mature for scaling-up?" *Sci. Total Environ.* 912: 168716. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.168716.
- Valanciene, Egle, Ilona Jonuskiene, Michail Syrpas, Ernesta Augustiniene, Paulius Matulis, Andrius Simonavicius, and Naglis Malys. 2020. "Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis." *Biomolecules* 10 (874).
- Varman, Arul M., Lian He, Rhiannon Follenfant, Weihua Wu, Sarah Wemmer, Steven A. Wrobel, Yinjie J. Tang, and Seema Singh. 2016. "Decoding how a soil bacterium extracts building blocks and metabolic energy from ligninolysis provides roadmap for lignin valorization." *PNAS* 113 (40): E5802-E5811. doi:10.1073/pnas.1606043113.
- Verified Market Reports. 2024. "Syringic acid market insights." Washington. <https://www.verifiedmarketreports.com/product/syringic-acid-market/>.
- Wu, Jingyi, Yaw-Syan Fu, Kaihuang Lin, Xin Huang, Yi-jing Chen, Dong Lai, Ning Kang, Liyue Huang, and Ching-Feng Weng. 2022. "A narrative review: The pharmaceutical

evolution of phenolic syringaldehyde." *Biomed. Pharmacother.* 153: 113339.
doi:10.1016/j.biopha.2022.113339.

Zhao, Qiang, Shengjie Yue, Muhammad Bilal, Hongbo Hu, Wei Wang, and Xuehong Zhang. 2017. "Comparative genomic analysis of 26 *Sphingomonas* and *Sphingobium* strains: Dissemination of bioremediation capabilities, biodegradation potential and horizontal gene transfer." *Sci. Total Environ.* 609: 1238-1247.
doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.249.