

Інститут біології клітини  
Національна академія наук України

Інститут біології клітини  
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ВАСИЛИШИН РОКСОЛАНА ВАСИЛІВНА**

УДК 576.343:582.282.232

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**КОНСТРУЮВАННЯ ПОЛІПШЕНИХ ПРОДУЦЕНТІВ**  
**ЕТАНОЛУ ТА ГЛУТАТІОНУ У**  
**ДРІЖДЖІВ *OGATAEA POLYMORPHA***

03.00.07 – мікробіологія

09 біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_Василишин Р. В.

Науковий керівник: Сибірний Андрій Андрійович, доктор біологічних наук,  
професор

Львів – 2021

## АНОТАЦІЯ

**Василишин Р.В. Конструювання поліпшених продуцентів етанолу та глутатіону у дріжджів *Ogataea polymorpha*. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 Мікробіологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2021.

Дисертація присвячена опрацюванню та застосуванню підходів метаболічної інженерії, що забезпечують отримання штамів дріжджів *Ogataea polymorpha* з підвищеним рівнем продукції етанолу з ксилози та штамів з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону.

Виробництво біоетанолу, а також біогазу та біодизелю є найбільш успішним «зеленим» процесом, що вже більше століття зберігає свої позиції на біоенергетичному ринку. Первинним кінцевим споживачем біоетанолу є транспортний сектор, проте у його використанні також зацікавлена фармакологічна та харчова промисловість. Сьогодні виробництво біоетанолу в комерційних масштабах здійснюється із використанням харчових культур, таких як кукурудза в США; цукрова тростина, маніока та солодка картопля у Бразилії; пшениця, овес і цукровий буряк у Європі. Біоетанол, який виробляють з харчової сировини, отримав назву етанолу першого покоління. Оскільки дискусія "паливо проти їжі" все ще актуальна, спільнота дослідників визнала, що повна заміна викопних палив не може бути забезпечена лише біопаливом першого покоління [1]. Як наслідок, лігноцелюлозні залишки аграрної та деревообробної промисловостей є нехарчовою та дешевою сировиною, почали вивчати як потенційний субстрат для отримання біоетанолу. Біоетанол з лігноцелюлози (сухої рослинної біомаси), отримав назву етанолу другого покоління [2].

Розробка ефективних технологій для виробництва паливного етанолу з лігноцелюлозних залишків має важливе економічне та екологічне значення, оскільки лігноцелюлоза є дешевою поновлюваною сировиною. Другим за

вмістом цукром у складі лігноцелюлози, що використовується для отримання етанолу другого покоління, є ксилоза (близько 30%) [3]. Пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, яких використовують для отримання етанолу в промислових масштабах, не здатні зброджувати ксилозу. Однак, отримання етанолу з лігноцелюлози може бути здійснене рекомбінантними штамми *S. cerevisiae* або деякими видами неконвенційних дріжджів.

Дріжджі *Ogataea (Hansenula) polymorpha* належать до природних ксилозоферментуючих видів дріжджів. Ці дріжджі володіють значним потенціалом для використання у процесі одночасної сахарифікації та ферментації (SSF) лігноцелюлози, оскільки є термотолерантними мікроорганізмами, максимальна температура росту яких становить 50°C [4].

За допомогою поєднання метаболічної інженерії та класичної селекції було отримано рекомбінантні штамми дріжджів *O. polymorpha* з підвищеною ефективністю високотемпературної алкогольної ферментації ксилози [5]. Хоча продукція етанолу з ксилози у рекомбінантних штамів була підвищена у 25 разів порівняно із продукцією штаму дикого типу, споживання ксилози під час ферментації відбувалося повільно та неповністю. Крім того, під час збродження ксилозо-глюкозних сумішей незалежно від концентрації глюкози, глюкоза споживається в першу чергу, інгібуючи утилізацію ксилози. Почергове споживання обох цукрів обумовлює збільшення тривалості процесу ферментації та зменшує його ефективність. Отже, одним з лімітуючих чинників збродження вивільнених цукрів гідролізатів лігноцелюлози є низька ефективність транспорту ксилози [6]. Для налагодження рентабельного виробництва етанолу з гідролізатів лігноцелюлози важливим завданням є досягнення одночасного споживання глюкози та ксилози з високою ефективністю.

Одним з підходів підвищення ефективності транспорту ксилози є експресія гетерологічних транспортерів з високою спорідненістю до ксилози в *O. polymorpha*, проте проблемою такого підходу є забезпечення правильної

локалізації гетерологічних білків в цитоплазматичній мембрані. Альтернативним підходом є ідентифікація та білкова інженерія власних транспортерів *O. polymorpha* для підвищення ефективності транспорту ксилози [7]. Відомо, що білкова інженерія глюкозо-ксилозних транспортерів, спрямована на підвищення ефективності транспорту ксилози в клітини дріжджів *S. cerevisiae*, є важливою передумовою створення рекомбінантних штамів для економічно вигідного виробництва етанолу з лігноцелюлози [8, 9].

У геномі штама дикого типу *O. polymorpha* був виявлений функціональний гексозний транспортер Hxt1 з високою гомологією до низькоафінних гексозних транспортерів Hxt1 та Hxt3 *S. cerevisiae*. Внаслідок експресії гена *HXT1* *O. polymorpha* спостерігалось відновлення росту штама *S. cerevisiae* з делецією гексозних транспортерів [10]. Проте, відомо, що низькоафінні транспортери, які здатні забезпечувати транспорт глюкози та ксилози, індукуються за наявності високої концентрації глюкози та швидко деградують і видаляються з цитоплазматичної мембрани після вичерпання глюкози з середовища [9].

Під час виконання дисертаційної роботи, з метою підвищення питомої швидкості поглинання ксилози та зниження спорідненості до глюкози, вперше було створено модифіковану форму транспортера Hxt1 *O. polymorpha* шляхом заміни аспарагіну на аланін в положенні 358. Крім того, залишки лізину на N-кінці Hxt1, що є потенційними сайтами убіквітинування, було замінено на залишки аргініну для запобігання швидкої деградації транспортера. В результаті проведених досліджень здійснено посилення експресії модифікованих форм Hxt1 в геномі *hxt1Δ* мутанта *O. polymorpha* та визначено ефективність споживання ксилози і глюкози під час високотемпературної алкогольної ферментації. За допомогою використання зеленого флюоресцентного білка GFP було досліджено час існування нативної та модифікованих форм Hxt1 в цитоплазматичній мембрані. Модифікацію Hxt1, що обумовлювала покращення одночасного споживання обидвох цукрів штамом дикого типу, було здійснено в

геномі попередньо отриманого рекомбінантного штаму *O. polymorpha* з підвищеною продукцією етанолу з ксилози [5, 11].

У попередніх дослідженнях вперше був показаний позитивний ефект дерепресії пероксисомних ферментів дигідроксиацетонсинтази (пероксисомна транскетолаза) та трансальдолази на алкогольну ферментацію ксилози у штама дикого типу [12].

У даній роботі було здійснено посилення експресії генів, що кодують пероксисомні ферменти транскетолазу *Das1* (дигідроксиацетонсинтаза) та трансальдолазу *Tal2* в геномі рекомбінантного штаму *O. polymorpha* з покращеними параметрами алкогольної ферментації ксилози. Встановлено, що внаслідок посилення експресії генів *DAS1* and *TAL2* продукція етанолу з ксилози зростає на 30%. У результаті проведених досліджень отримано рекомбінантний штаму *O. polymorpha*, що здатен утворювати 16 г/л етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації при 45°C [12].

Термотолерантні метилотрофні дріжджі *O. polymorpha* з природньо високим вмістом глутатіону та стійкістю до різних видів стресу також розглядаються як перспективні штами для генетичної модифікації та конструювання конкурентного продуцента цього трипептиду.

Цей трипептид є важливою природньою сполукою для медицини та біотехнології, оскільки відіграє суттєву роль в біовідновлювальних реакціях, транспорті, захисті проти небезпечних активних форм кисню, продуктів пероксидації та вірусних інфекцій. Генетичні дефекти системи глутатіону у людини призводять до розвитку ряду спадкових хвороб (напр., нейро- та міопатії), а виснаження по GSH внаслідок неповноцінної дієти має результатом так звані вільно радикальні патології [13]. Найбільш дієвим та фізіологічним способом забезпечення організму необхідними антиоксидантами є широке застосування в харчуванні здорових і хворих людей біологічно активних добавок, що містять GSH.

У дріжджів *O. polymorpha* ген, що кодує перший фермент біосинтезу глутатіону, глутамілцистеїнсинтетазу, отримав назву *GSH2* [14]. Проте, механізм регуляції біосинтезу глутатіону у метилотрофних дріжджів залишається малодослідженим. Як описано раніше, посилення експресії гена *GSH2* у дріжджів *O. polymorpha* за рахунок мультикопійної інтеграції або під контролем сильного регульованого промотора гена алкогольоксидази обумовлювало суттєве підвищення продукції глутатіону [15].

Під час виконання дисертаційної роботи завдяки додатковому посиленню експресії гена *MET4* вдалося підвищити вміст внутрішньоклітинного глутатіону в штаммах *O. polymorpha* з посиленою експресією гена *GSH2* в 5 разів порівняно із штамом дикого типу, досягнувши 2167 мг/л. Під час культивування в біореакторі штам з посиленою експресією генів *GSH2* та *MET4* протягом 25 годин був здатний утворювати в 5 разів більше глутатіону порівняно із штамом з надекспресією лише гена *GSH2*. Отримані результати свідчать про залучення транскрипційного фактора Met4 в регуляцію біосинтезу глутатіону у дріжджів *O. polymorpha* [16, 17, 18].

Зазначені результати важливі для розуміння генетичного контролю метаболізму ксилози у дріжджів, а розроблені під час виконання дисертаційної роботи рекомбінантні штами *O. polymorpha* можуть бути використані для подальшого підвищення ефективності алькогольної ферментації. Крім цього, отримані результати свідчать про створення штаму *O. polymorpha*, який характеризується одним з найкращих показників продукції глутатіону в порівнянні з іншими відомими дріжджовими продуцентами цього трипептиду. Також в даній роботі було встановлено важливість глутатіону для продукції етанолу у дріжджів *O. polymorpha* за умов підвищеної температури як стресового чинника й наявності ксилози, що є менш ефективним для зброджування джерелом Карбону порівняно з глюкозою.

**Ключові слова:** біоетанол, лігноцелюлоза, ксилоза, *Ogataea polymorpha*, пероксисомні ферменти, глутатіон.

## SUMMARY

**Vasylyshyn R.V. Construction of improved ethanol and glutathione producers in yeast *Ogataea polymorpha*.** – Manuscript. Thesis for PhD degree in Biology (specialty 03.00.07 "Microbiology"). – Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2020.

The dissertation is devoted to the development and application of metabolic engineering approaches that provide for obtaining *Ogataea polymorpha* strains with improved efficiency of ethanol production from xylose and increased glutathione production.

The production of bioethanol, along with biogas and biodiesel is the most successful "green" process, which for more than a century has maintained its position in the bioenergy market. The primary final consumer of this alcohol is the transport sector, but the pharmacological and food industries are also interested in the use of ethanol. Today, the production of bioethanol on a commercial scale is carried out using competing food crops, such as corn in the United States; sugar cane, cassava and sweet potatoes in Brazil; wheat, oates and sugar beetes in Europe. Although the debate over "fuel versus food" is still relevant, the research community has acknowledged that a complete replacement of fossil fuels cannot be provided by first-generation biofuels alone. Thus, lignocellulose residues of the agricultural, food and woodworking industries have become the main substrate for the production of second-generation bioethanol.

The development of efficient technology for the production of fuel ethanol from lignocellulosic residues of agriculture and wood industry is of great importance for economics and environment because utilizes the cheap and renewable feedstock. However, the lignocellulosic biomass which is used to produce 2<sup>nd</sup> generation ethanol contains a significant amount of xylose (about 30%) [3]. In industrial fermentation processes *Saccharomyces cerevisiae* is generally used for ethanol production but this yeast cannot naturally ferment pentose sugars like xylose. Potentially, ethanol

production from lignocellulosics can be fulfilled effectively by engineered *S. cerevisiae* strains or some of non-conventional yeasts.

The thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* belongs to the native xylose-fermenting yeast species with ability to ferment xylose at elevated temperatures (up to 50 °C). Such property of this yeast defines it as a good candidate for the development of an efficient process for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic hydrolyzates [4].

The advanced *O. polymorpha* ethanol producer from xylose was isolated by combination of the methods of metabolic engineering and classical selection [5]. Although such recombinant strains were characterized by 25-fold improved ethanol production from xylose as compared to the wild-type strain, xylose uptake was slow and incomplete. Moreover, in mixed sugar fermentations with varying glucose concentrations glucose remained the preferred sugar which was consumed first. Therefore, one of the main drawbacks of the efficient conversion of liberated sugars from lignocellulosic hydrolyzates is insufficient transport of xylose due to competitive inhibition by glucose [6]. However, in an industrial application it is preferred that both sugars are fermented simultaneously and at high rates to generate an economically feasible process.

To improve the xylose uptake activity in yeasts it is necessary to identify specific transporters mediating the uptake of xylose. One approach is to express specific xylose transporters from other organisms in *O. polymorpha*. However, problem with heterologous expression of xylose transporters is inefficient targeting to the plasma membrane. A more favorable solution is identification and optimization of endogenous transporters for improved ability to transport xylose [7].

As a result, it was found that the engineering of endogenous transporters for the facilitation of glucose-xylose co-consumption is an important prerequisite for efficient ethanol production from lignocellulosic hydrolysates.

Hxt1, the first functional hexose transporter, was identified in *O. polymorpha* wild-type strain with high similarity to low affinity *S. cerevisiae* Hxt1 and Hxt3



transporters. Expression of *O. polymorpha* *HXT1* gene was able functionally complement growth deficiency of hexose transporterless mutant of *S. cerevisiae*, incapable to grow on hexoses [10]. However, it was reported for low-affinity glucose/xylose transporters in *S. cerevisiae* their induction at high glucose concentrations with subsequent rapid degradation from the plasma membrane in the absence of glucose or when glucose is exhausted from the medium [9].

To increase the specific xylose uptake rate and decrease affinity to glucose the modified Hxt1 was engineered in *O. polymorpha* by substitution of asparagine to alanine at position 358. Furthermore, N-terminal lysine residues of Hxt1 predicted to be the target of ubiquitination were replaced for arginine residues [8, 9]. The modified versions of Hxt1 were overexpressed in *hxt1Δ O. polymorpha* mutant and the efficiency of xylose and glucose co-utilization during high-temperature xylose fermentation was studied. The kinetics of consumption of both sugars during mixed sugar fermentation with different ratio of xylose and glucose was observed. The retention of the mutated Hxt1 versions at the cytoplasmic membrane was studied using fluorescent reporter GFP and compared to the native one. The modified version of Hxt1 able to improve efficiency of glucose and xylose co-consumption was integrated into genome of the available *O. polymorpha* recombinant strain with improved ethanol production during high-temperature alcoholic fermentation [11].

The positive effect of derepression of peroxisomal enzymes dihydroxyacetone synthase (peroxisomal transketolase) and peroxisomal transaldolase on alcoholic fermentation of xylose in the wild-type strain was reported in previous studies for the first time [12]. In this study genes encoding the peroxisomal enzymes transketolase Das1 and transaldolase Tal2 were overexpressed in the best obtained *O. polymorpha* recombinant strain with improved parameters of xylose alcoholic fermentation. The productivity of ethanol synthesis in the obtained strains was studied during alcoholic fermentation and it was shown that overexpression of *DAS1* and *TAL2* genes leads to the improvement of ethanol production from xylose by 30%, reaching 16 g/L ethanol [12].

Thermotolerant methylotrophic yeast *O. polymorpha* with naturally high glutathione concentration and resistance to various types of stress are also considered as promising strains for genetic modification and construction of a competitive producer of this tripeptide.

This tripeptide is important natural compound for medicine and biotechnology, as it plays a significant role in bioregenerative reactions, transport, protection against hazardous reactive oxygen species, peroxidation products and viral infections. Genetic defects in the glutathione system in humans lead to the development of a number of inherited diseases (eg, neuro- and myopathy), and GSH depletion due to poor diet results in so-called free radical pathologies [13]. The most effective and physiological way to provide the body with the necessary antioxidants is the widespread use in the diet of healthy and sick people of dietary supplements containing GSH.

The *GSH2* gene encodes the first enzyme of glutathione biosynthesis in yeast *O. polymorpha* [14]. The overexpression of *GSH2* gene due to multicopy integration or under control of a strongly regulated promoter of alcohol oxidase results in improvement of glutathione production in the yeast *O. polymorpha* [15]. Additional expression of the *MET4* gene, which is involved in the regulation of sulfate assimilation in sulfur-containing amino acids, led to increase of the intracellular glutathione by 5 times as compared to the wild-type strain, reaching 2167 mg/L. A strain with overexpressed *GSH2* and *MET4* genes was able to produce 5 times more glutathione as compared to a strain with overexpression only of *GSH2* gene during cultivation for 25 hours in a bioreactor. Data of this study show the importance of *MET4* gene coding for transcription activator involved in sulfur metabolism in yeasts for regulation of glutathione biosynthesis in *O. polymorpha* [16, 17, 18].

Obtained results are important for understanding the genetic control of xylose metabolism in yeast, and can be used to further increase the efficiency of alcoholic fermentation. In addition, the results show the creation of a strain of *O. polymorpha*, which is characterized by one of the best level of glutathione production compared to

the yeast producers of this tripeptide, which are currently known, and indicate the importance of glutathione for high-temperatures xylose alcoholic fermentation.

**Key words:** bioethanol, *Ogataea polymorpha*, lignocellulose, xylose, peroxisomal enzymes, glutathione.

## Список публікацій здобувача:

За темою дисертації опубліковано 27 наукових робіт, серед яких 4 статті у міжнародних виданнях Scopus, 1 розділ у монографії, а також 22 тези доповідей у матеріалах конференцій, наукових з'їздів та конгресів.

1. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Ruchala J, Shevchuk N, Kuliesiene N, Khroustalyova G, Rapoport A, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast. *Microbial Cell Factories*. 2020;19(1):96. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, провела аналіз та узагальнення отриманих даних, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

2. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Stasyk O, Dmytruk O, Dmytruk K, Sibirny A. Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11(1):197. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).

3. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Fickers P, Sibirny A. Gene of the transcriptional activator *MET4* is involved in regulation of glutathione biosynthesis in the methylotrophic yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *FEMS Yeast Res*. 2018;18(2):133. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації)

4. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Martynyuk N, Skorohod V, Sibirny A. Development of glutathione production technology based on designed active yeast overproducers. *Science and innovation*. 2015;11(5):63-65. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних)

5. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of the efficient glutathione producers in the yeast *Hansenula polymorpha*. Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds: Monograph. University of Rzeszow. 2015;11(5):323-332. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних)

6. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. Metabolic engineering of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* for construction of the high-temperature ethanol producers from xylose. X International Students Scientific Camp «New commercial and ecological food from Romania and Poland»; 2016 February 11-14; Oradea, Romania. P. 144

7. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Krasovska O, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. New targets for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. 6th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment”; 2016 April 21 – 22; Rzeszow, Poland. P. 66.

8. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A., Improvement of xylose alcoholic fermentation by derepression of two peroxisome localized enzymes in yeast *Hansenula polymorpha*. 6th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment”; 2016 April 21 – 22; Rzeszow, Poland. P.126.

9. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Metabolic engineering of *Hansenula (Ogataea) polymorpha* for improving high-temperature xylose alcoholic fermentation. 14<sup>th</sup> International Congress on Yeasts; 2016 September 11-15; Awaji Island, Japan. P. 256-257

10. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. The effect of derepression of two peroxisome localized enzymes on high-temperature xylose alcoholic fermentation in yeast *Hansenula polymorpha*. International Symposium on Cell Biology jointly with 5<sup>th</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology; 2016 October 2-6; Odessa, Ukraine. P. 53.

11. **Vasylyshyn R.** Engineering of the hexose transporter Hxt1 for improved utilization of xylose during high-temperature xylose alcoholic fermentation in yeast *Ogataea polymorpha*. Conference of young scientists of Institute of cell biology NAN of Ukraine; 2017 May 25; Lviv, Ukraine. P.15

12. **Vasylyshyn R,** Kurylenko O, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Improvement of xylose utilization during high-temperature xylose alcoholic fermentation in the yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* by engineering of the hexose transporter Hxt1. 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33); 2017 June 26-29; Cork, Ireland. P. 27.

13. Kurylenko O, **Vasylyshyn R,** Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Studying the role of cytosolic transketolase and transaldolase in xylose metabolism and fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33); 2017 June 26-29; Cork, Ireland. P. 25.

14. Kurylenko O, **Vasylyshyn R,** Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Studying the role of pentose phosphate pathway in xylose metabolism and fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 7th Congress of European Microbiologists; 2017 July 9-13; Valencia, Spain. P. 189-190

15. Kurylenko O, **Vasylyshyn R,** Ruchala J, Dmytruk K, Sybirny A. Studying the role of transketolase and transaldolase with cytosolic and peroxisomal localization in the yeast *Ogataea polymorpha*. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського; 2017 вересня 11-15; Одеса, Україна. С. 48-49

16. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R,** Dmytruk K, Sibirny A. Role of peroxisomal and cytosolic transketolase and transaldolase in xylose alcoholic fermentation in the methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. 7th International Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P. 42.

17. **Vasylyshyn R,** Kurylenko O, Dmytruk K, Sybirny A. Engineering of the hexose transporter Hxt1 for improved utilization of xylose during high-temperature

xylose alcoholic fermentation in the yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. 7th International Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P. 166.

18. Shevchuk N, **Vasylyshyn R**, Kolisnyk Y. Engineering of yeast *Ogataea polymorpha* with increased expression of modified hexose transporters. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of biology”; 2018 April 10-12; Lviv, Ukraine. P. 221-222.

19. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Bratiychuk D, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Role of oxidative and non-oxidative parts of pentose phosphate pathway in xylose alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha*. Non-Conventional Yeasts: from basic research to application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 80.

20. **Vasylyshyn R**, Shevchuk N, Kurylenko O, Dmytruk K, Sybirny A. Improvement of xylose alcoholic fermentation in yeast *Ogataea polymorpha* by modifications of hexose transporters Non-Conventional Yeasts: from basic research to application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 141.

21. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Shevchuk N, Daugelavičius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of the yeast *Ogataea polymorpha* with expression of the modified hexose transporters. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P. 30.

22. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. The role of pentose phosphate pathway in xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P. 28.

23. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Evaluation of transcriptional factors involved in regulation of xylose metabolism and fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine. P.65.

24. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Daugelavičius R, Dmytruk K, Sibirny A.. Engineering of the hexose transporters in the yeast *Ogataea polymorpha* for improved utilization of xylose during high-temperature alcoholic fermentation. 6th Ukrainian

Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine. P.82.

25. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Identification of transcriptional factors involved in regulation of xylose fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 8th International Weigl Conference: Human Welfare and Infectious Diseases in a New Microbiome Research Area. Microorganisms in industrial and medical biotechnology; 2019 June 26-28; Lodz, Poland. P.98.

26. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Shevchuk N, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of hexose transporters in the yeast *Ogataea polymorpha* for improved utilization of xylose. 8th International Weigl Conference: Human Welfare and Infectious Diseases in a New Microbiome Research Area. Microorganisms in industrial and medical biotechnology; 2019 June 26-28; Lodz, Poland. P.136.

27. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Evaluation of transcriptional factors involved in the regulation of glucose and xylose metabolism and fermentation in yeast *Ogataea polymorpha*. 8th Congress of European Microbiologists; 2019 July 7-11; Glasgow, Scotland. P. 782.



## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ .....	2
SUMMARY .....	7
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ .....	12
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	20
ВСТУП .....	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	31
1.1. Етанол та його застосування як біопаливо .....	31
1.2. Лігноцелюлоза як альтернативне джерело енергії .....	32
1.3. Процес отримання паливного етанолу другого покоління .....	33
1.4. Метаболізм ксилози у мікроорганізмів .....	36
1.4.1. Транспорт глюкози та ксилози у дріжджів .....	38
1.4.2. Метаболічна інженерія термотолерантних дріжджів <i>Ogataea polymorpha</i> з метою подолання лімітуючих етапів катаболізму ксилози .....	43
1.4.3. Роль пероксисомних ферментів в метаболізмі ксилози у метилотрофних дріжджів .....	46
1.5. Глутатіон та його біотехнологічне виробництво .....	47
1.6. Метаболізм глутатіону у клітинах дріжджів та регулювання його продукції й деградації .....	50
1.7. Фактори захисту клітин в стресових умовах алкогольної ферментації .....	55
1.8. Підсумок .....	57
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	58
2.1. Матеріали досліджень .....	58
2.2. Штами мікроорганізмів .....	58
2.3. Плазмідні .....	59
2.4. Праймери .....	60
2.5. Поживні середовища .....	61
2.6. Біохімічні методи .....	62

2.6.1. Отримання безклітинних екстрактів .....	62
2.6.2. Визначення активності ферментів .....	63
2.6.3. Визначення вмісту GSH в клітинах .....	63
2.7. Основні молекулярно-генетичні методи .....	64
2.7.1. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів .....	64
2.7.2. Виділення плазмідної ДНК з клітин <i>E. coli</i> .....	65
2.7.3. Конструювання векторів .....	66
2.7.4. Трансформація дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	67
2.7.5. Базові молекулярно-генетичні методи .....	67
2.7.6. ПЛР у реальному часі .....	68
2.8. Умови алкогольної ферментації дріжджів .....	69
2.9. Програмне забезпечення для пошуку та аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей .....	69
2.10. Визначення концентрації аналітів .....	70
2.11. Статистичний аналіз експериментальних даних .....	70
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	72
3.1. Конструювання рекомбінантних штамів <i>O. polymorpha</i> здатних до одночасного споживання глюкози та ксилози за умов високотемпературної алкогольної ферментації .....	72
3.1.1. Білкова інженерія гексозного транспортера Hxt1 для підвищення ефективності транспорту ксилози у дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	75
3.1.2. Посилення експресії модифікованих форм Hxt1 в геномі <i>hxt1Δ</i> мутанта <i>O. polymorpha</i> .....	78
3.1.3. Характеристика алкогольної ферментації отриманих рекомбінантних штамів <i>O. polymorpha</i> з посиленою експресією модифікованих форм Hxt1 .....	82
3.1.4. Аналіз локалізації гібридного білка Hxt1-GFP в клітинах <i>O. polymorpha</i> за допомогою флуоресцентної мікроскопії .....	87

3.1.5. Посилення експресії модифікованого ендogenousного транспортера Hxt1 та модифікованих гетерологічних транспортерів Gal2 та Hxt7 <i>S. cerevisiae</i> в геномі покращеного продуцента етанолу з ксилози <i>O. polymorpha</i> .....	89
3.1.6. Характеристика алкогольної ферментації отриманих рекомбінантних штамів <i>O. polymorpha</i> з посиленою експресією модифікованих транспортерів Hxt1, Gal2 та Hxt7 .....	94
3.2. Дослідження ролі пероксисомних ферментів в метаболізмі та алкогольній ферментації ксилози у дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	101
3.2.1. Посилення експресії генів, що кодують пероксисомні ферменти транскетолазу Das1 та трансальдолазу Tal2 у найкращого з отриманих рекомбінантних штамів <i>O. polymorpha</i> з підвищеним рівнем продукції етанолу .....	102
3.2.2. Характеристика алкогольної ферментації отриманих рекомбінантних штамів дріжджів <i>O. polymorpha</i> з посиленою експресією генів <i>DAS1</i> та <i>TAL2</i> .....	105
3.3. Конструювання штамів дріжджів <i>O. polymorpha</i> з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону .....	108
3.3.1. Отримання штамів дріжджів <i>O. polymorpha</i> з посиленою експресією гена транскрипційного активатора Met4 .....	109
3.3.2. Дослідження продукції глутатіону отриманими рекомбінантними штамми дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	112
3.3.3. Дослідження ролі глутатіону в алкогольній ферментації у дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	118
3.4. Підсумок .....	121
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....	123
ВИСНОВКИ .....	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	137
ДОДАТОК1 .....	159

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ATP – аденозин-5'-трифосфат
- CARG – сукупній середньорічний темп зростання об'ємів виробництва
- CG – L-цистеїнілгліциндипептидаза
- DTT – дитіотреїтол
- GPx – глутатіонпероксидаза
- GR – глутатіонредуктаза
- Grx – глутаредоксинова система
- GS –  $\gamma$ -глутамілцистеїнгліциллігаза
- GSH – глутатіон
- GSSG – окиснений глутатіон
- GST – глутатіон-S-трансфераза
- NAD – нікотинамідаденіндинуклеотид
- NADH – нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
- NADP – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
- NADPH – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
- OD – оптична густина
- ORF – відкрита рамка зчитування
- ROS – активні сполуки кисню
- SDS – додецилсульфат натрію
- SSF – одночасна сахарифікація та ферментація
- TPP – тіамініпрофосфат
- Trx – тіоредоксинова система
- WT – Wild Type, штам дикого типу
- YNB – середовище на основі yeast nitrogen base
- $\gamma$ -GCS –  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетаза
- $\gamma$ -GT –  $\gamma$ -глутамілтранспептидаза
- АДГ – алкогольдегідрогеназа

ДАС – дигідроксиацетонсинтаза  
ЕДТА – етилендіамінтетраацетат, динатрієва сіль  
КІ – ксилозоізомераза  
КДГ – ксилітолдегідрогеназа  
КК – ксилулокіназа  
КР – ксилозоредуктаза  
п.н. – пар нуклеотидів  
ПДК – піруватдекарбоксілаза  
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція  
ПФШ – пентозофосфатний шлях  
т.п.н. – тисяч пар нуклеотидів  
ТАЛ – трансальдолаза  
ТКЛ – транскетолаза  
ФАД – флавінаденіндинуклеотид  
ФДФ – фруктозо-1,6-дифосфатаза

## ВСТУП

### Актуальність теми

Питання забезпечення енергоносіями для будь-якої країни світу, в тому числі й для України, відноситься до сфери національної безпеки. Пошук альтернативних джерел енергії є першочерговою проблемою. Етиловий спирт, отриманий біоконверсією поновлювальної рослинної сировини, має значний потенціал для розвитку біоенергетики та розробки технологій утилізації відходів сільського господарства, деревообробної промисловості та побутових відходів. Етанол із біомаси, що застосовується як паливо, називають паливним етанолом або біоетанолом.

У США та ЄС проблема біопалива загалом і біоетанолу, зокрема, лежить у руслі головної стратегії – збереження довкілля і боротьби із змінами клімату на планеті, що значною мірою й обумовлює прагнення зменшити використання викопних видів палива та знайти альтернативу, яка не вимагає значних витрат. Нафтотрейдери зацікавлені у виведенні на ринок палива із вмістом біоетанолу, оскільки біопаливо має екологічні переваги, легко змішується зі звичайним бензином, не містить шкідливих для автомобіля компонентів, а завдяки наявності спирту забезпечує промивання двигуна і усієї паливної системи від домішок, що використовуються з метою покращення процесу згорання палива та мають небажані екологічні наслідки [19].

Широке виробництво паливного біоетанолу в Україні є перспективним напрямом не лише для зменшення енергетичної залежності від постачальників нафти та природного газу, а й єдиною реальною можливістю здешевити ринкову ціну пального. Головною причиною, яка зупиняє закупівлі спиртовмісного палива в Україні, є неврегульованість питання з акцизом та завищені ставки акцизного податку. Втім, процес також потребує стабільного ринку сировинних

ресурсів, розробки технології продукції паливного етанолу та відповідних інноваційних технічних прийомів, включаючи отримання високоефективних штамів спиртових дріжджів [3, 4].

На сьогодні практично весь етанол отримується шляхом мікробної ферментації з харчової сировини, зазвичай, цукру або крохмалю. Важливе економічне та екологічне значення має розроблення ефективних технологій для виробництва паливного етанолу з дешевої поновлюваної сировини - лігноцелюлозних залишків аграрної та деревообробної промисловостей. Однак вартість паливного етанолу з лігноцелюлозних відходів наразі занадто висока для їх впровадження в промислових масштабах. Тому поліпшення та удосконалення мікробних продуцентів цього спирту з нехарчової сировини є актуальним завданням.

Попередні дослідження з метою отримання рекомбінантних штамів, природньо ферментуючих ксилозу видів дріжджів *Ogataea polymorpha*, з підвищеною ефективністю високотемпературної алкогольної ферментації ксилози, мали позитивний результат. Однак, залишились не з'ясованими низка лімітуючих чинників метаболізму зазначеної пентози. Тому у виконаній роботі представлено застосування відомих та розробку нових оригінальних підходів метаболічної інженерії для покращення високотемпературної алкогольної ферментації ксилози у дріжджів *O. polymorpha*.

Дана робота також ілюструє потенціал метилотрофних термотолерантних дріжджів *O. polymorpha* як перспективних продуцентів глутатіону та фізіологічну роль глутатіону за умов спиртового бродіння. На сьогодні, глутатіон є одним з найбільш досліджених антиоксидантів. Широке використання зазначеного трипептиду як активного компонента лікарських засобів, продуктів харчування та косметичних засобів, обумовлює постійне зростання попиту на глутатіон. Мікробіологічний синтез із використанням

дріжджів є найпоширенішим методом виробництва глутатіону. Дріжджі *O. polymorpha* вирізняється високою стійкістю до різних стресових умов, викликаних важкими металами, ксенобіотиками та іншими забруднювачами, проте механізми регулювання спиртового бродіння за участю глутатіону залишаються невідомими. Метаболічна інженерія спрямована на створення надпродуцентів глутатіону та оптимізація технології його виробництва може задовільнити потреби світового ринку.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дана робота є частиною фундаментальних досліджень відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темами: «Застосування метаболічної інженерії метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* для покращення алкогольної ферментації альтернативних джерел вуглецю (ксилози та гліцерину)» (№ держреєстрації 0114U000592, 2013-2017); «Комп'ютерне моделювання *in silico* як основа раціональної метаболічної інженерії дріжджів *Hansenula polymorpha* для поліпшення параметрів високотемпературної алкогольної ферментації ксилози» проект № 6188 спільного конкурсу НАН України та Українського науково-технологічного центру (№ держреєстрації 0116U006364, 2015-2017); «Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмів: алкогольна ферментація, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глутатіону» (№ держреєстрації 0116U002209, 2018-2020); цільової програми наукових досліджень НАН України «Біопаливні ресурси і біоенергетика» (№ держреєстрації 0118U006196, 2018-2022).

Окремі розділи дисертаційної роботи виконувалися у рамках індивідуального гранту «Engineering of xylose transporters in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha* for improvement of alcoholic fermentation», FEMS-GO-



2018-225. Автор дисертаційної роботи є єдиним (FEMS-GO-2018-225) або одним із виконавців вищезгаданих досліджень.

### **Мета і завдання дослідження**

Метою даної роботи були розробка та застосування підходів метаболічної інженерії для отримання штамів дріжджів *O. polymorpha* з підвищеною ефективністю високотемпературної алкогольної ферментації ксилози та підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону.

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

- Здійснити посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* в геномі штаму 2EthOH<sup>-</sup>/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8*Δ, отриманого методами метаболічної інженерії та класичної селекції, що характеризується підвищеною продукцією етанолу з ксилози.
- Сконструювати модифіковані форми транспортера *Hxt1* *O. polymorpha* із заміною залишків лізину на N-кінці білка (заміна сайтів убіквітинування) та заміною аспарагіну на аланін в положенні 358.
- Отримати штами дріжджів *O. polymorpha* з посиленням експресії ізоформ гена *HXT1*, що кодує нативну форму або модифіковані форми транспортера *Hxt1* та дослідити вплив посилення експресії *HXT1* на ріст та ефективність ко-ферментації глюкози та ксилози дріжджів *O. polymorpha*.
- Сконструювати штами дріжджів *O. polymorpha* з модифікованим геном *HXT7 Saccharomyces cerevisiae* в положенні 370 шляхом заміни аспарагіну на фенілаланін та з модифікованим геном *GAL2 S. cerevisiae* в положенні 376 шляхом заміни аспарагіну на серин та дослідити вплив здійснених модифікацій на ефективність споживання ксилози та глюкози дріжджами *O. polymorpha* під час алкогольної ферментації.
- Сконструювати штами дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним вмістом

внутрішньоклітинного глутатіону за рахунок посилення експресії гена транскрипційного активатора Met4.

- Дослідити вплив підвищеного вмісту внутрішньоклітинного глутатіону на продуктивність алкогольної ферментації у *O. polymorpha*.

**Об'єкт дослідження:** продукція етанолу з ксилози та регуляція продукції глутатіону у дріжджів *O. polymorpha*.

**Предмет дослідження:** конструювання рекомбінантних штамів дріжджів *O. polymorpha*, що здатні зброджувати ксилозу до етанолу та утворювати глутатіон.

#### **Методи досліджень.**

У роботі використовувалися різноманітні генетичні, біохімічні та мікробіологічні методи дослідження. Конструювання рекомбінантних векторів було здійснено за допомогою молекулярно-біологічних методів, таких як гідроліз ДНК ендонуклеазами рестрикції, елюція фрагментів ДНК з агарозного гелю, дефосфорилування лінеаризованих векторів, лігування вектора з вставкою та генетична трансформація бактерій та дріжджів. Для аналізу рекомбінантних штамів дріжджів використовували методи ПЛР та ПЛР у реальному часі. Здійснювали визначення активності низки ферментів у безклітинних екстрактах, а також параметрів алкогольної ферментації дріжджових штамів на різних субстратах та ін. У роботі широко використовувались методи комп'ютерного аналізу та комп'ютерні бази даних відомих генів.

## Наукова новизна одержаних результатів

Вперше встановлено, що в дріжджах *O. polymorpha* внаслідок посилення експресії модифікованих форм власного транспортера Hxt1, а також модифікованих гетерологічних транспортерів Hxt7 та Gal2 *S. cerevisiae*, покращується здатність споживати ксилозу під час збродження глюкозно-ксилозних сумішей. Отримані результати мають важливе значення для розуміння особливостей етапу транспорту ксилози у дріжджів, а також для конструювання штамів з покращеною ефективністю алкогольної ко-ферментації глюкози та ксилози.

Виявлено, що посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2*, які кодують пероксисомні ферменти трансальдолазу та дигідроксиацетонсинтазу, в геномі штаму *O. polymorpha* з покращеною продукцією етанолу з ксилози, підвищує нагромадження етанолу, що свідчить про участь цих ферментів в регуляції алкогольної ферментації ксилози.

Доведено, що підвищення рівня внутрішньоклітинного глутатіону за рахунок надекспресії гена транскрипційного активатора Met4 та гена першого фермента біосинтезу глутатіону *GSH2* покращує ефективність алкогольної ферментації ксилози у дріжджів *O. polymorpha* при 45 °C.

Отримані результати вказують на зв'язок між підвищеною здатністю до накопичення глутатіону та ефективністю продукції етанолу під час алкогольної ферментації за умов підвищеної температури як стресового чинника та за наявності ксилози, що є менш ефективним для збродження джерелом Карбону порівняно з глюкозою. Одержані дані про участь транскрипційного активатора Met4 в регуляції синтезу глутатіону розширюють сучасні знання щодо механізмів регуляції синтезу цього трипептиду у дріжджів.

## **Практичне значення одержаних результатів**

У результаті посилення експресії генів DAS1 та TAL2, які кодують пероксисомні ферменти трансальдолазу та дигідроксиацетонсинтазу, в геномі найкращого продуцента етанолу з ксилози отримано штами дріжджів *O. polymorpha*, що здатні в 40 разів ефективніше зброджувати ксилозу в порівнянні із штамом дикого типу. Здійснено оптимізацію процесу одночасної утилізації гексоз та пентоз за умов високотемпературної алкогольної ферментації за рахунок модифікації власного транспортера Hxt1, а також модифікованих гетерологічних транспортерів Hxt7 та Gal2 *S. cerevisiae*.

Створено рекомбінантний штам *O. polymorpha* з посиленою експресією гена MET4 (кодує транскрипційний активатор), який характеризується п'ятикратним підвищенням вмісту внутрішньоклітинного глутатіону, а також покращеною здатністю утворення етанолу в процесі алкогольної ферментації ксилози при 45°C.

Отримані рекомбінантні штами можуть використовуватись як вихідні для подальшого підвищення ефективності алкогольної ферментації основних цукрів гідролізатів лігноцелюлози. Опрацьовані у роботі підходи можуть бути використані для отримання надпродуцентів інших практично важливих сполук.

## **Особистий внесок здобувача**

Дисертантом спільно з науковим керівником розроблено план проведення досліджень та визначено методи розв'язання поставлених завдань. Аналіз та обговорення результатів досліджень, а також підготовку публікацій за темою дослідження проведено разом із науковим керівником. Експериментальні дослідження, результати яких викладені в дисертації, проведені дисертантом самостійно або спільно з співавторами публікацій. Частина результатів спільних досліджень використано в дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата

біологічних наук Куриленко О.О. [12]. Автор висловлює щирю подяку науковому керівнику, співавторам публікацій та усім працівникам, хто долучився до отримання викладених в дисертаційній роботі результатів досліджень.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей. Результати роботи доповідались на XXVII Міжнародній конференції по генетиці та молекулярній біології дріжджів (Levico Terme, Italy, 2015), VI Міжнародній конференції молодих вчених «Human – Nutrition –Environment» (Rzeszow, Poland, 2016), V з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Одеса, Україна, 2016), XIV Міжнародному дріжджовому конгресі (Awaji Island, Japan, 2016), X Міжнародному студентсько-науковому таборі «New commercial and ecological food from Romania and Poland» (Орадея, Румунія, 2016), XXXIII Міжнародному спеціалізованому симпозиумі по дріжджах ISSY33 (Корк, Ірландія, 2017), VII Міжнародній Вейгелівській конференції (Львів, Україна, 2017), Міжнародній конференції «Non-conventional yeasts: from basic research to application» (Жешув, Польща, 2018), Міжнародній конференції “Advances in Microbiology and Biotechnology” (Львів, Україна, 2018), VI Українському конгресі з клітинної біології із міжнародним представництвом (Яремче, Україна, 2019), VIII Міжнародній Вейгелівській конференції «Human Welfare and Infectious Diseases in a New Microbiome Research Area. Microorganisms in industrial and medical biotechnology» (Лодзь, Польща, 2019).

## **Публікації**

За темою дисертації опубліковано 27 наукових робіт, серед яких 4 статті у міжнародних виданнях Scopus, 1 розділ у монографії, а також 22 тез доповідей у матеріалах конференцій, наукових з'їздів та конгресів.

## **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація містить наступні розділи: "Вступ", "Огляд літератури", "Матеріали та методи", "Результати та їх обговорення", "Аналіз та узагальнення результатів", "Висновки" та "Список використаних джерел". Дисертацію викладено на 163 сторінках друкованого тексту, з них основна частина займає 115 сторінок. Робота містить 32 рисунки та 7 таблиць. Список використаної літератури налічує 201 джерело.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Етанол та його застосування як біопалива

Термін «біопаливо» охоплює всі види транспортного або рідкого палива, які виробляють з біомаси або іншої поновлюваної крохмалевмісної сировини [21]. Біомаса як енергетичний ресурс може мати декілька напрямів використання: її можна спалювати у вигляді тирси, деревини, паливних брикетів, гранул, переробляти у рідкі біопалива, а саме метилові ефіри, технічні спирти (метанол, етанол, бутанол), оливи та біодизель, а також виготовляти біогаз. Відповідні напрями демонструють широкий спектр можливостей та передумов для створення біоенергетичних комплексів, що забезпечать оптимальне співвідношення між витратами на вирощування й переробку вихідної біомаси та енергетичним складом цільової продукції [22].

Об'єми світового виробництва біоетанолу сьогодні сягнули 105 млн. тонн на рік [21]. Згідно з оцінками Renewable Fuels Association у 2019 році, виробництво етанолу є найбільш масштабним біотехнологічним процесом. За критеріями продукції та споживання Північноамериканський регіон очолив ринок біоетанолу у 2019 році, за ним слідує Бразилія, Європа, Китай, Близький Схід та Африка. Протягом періоду 2020-2024 років очікується, що Північноамериканський регіон зафіксує найвищий приріст завдяки підтримці, наданої урядом регіонам, та наявності землі для виробництва сировини [21].

На сьогоднішній день практично весь етанол на планеті, зокрема і паливний, одержують із традиційної сировини: сахарози та крохмалю, використовуючи для цього цукрову тростину в Бразилії та кукурудзяний крохмаль у США. Окрім біотехнологічного способу, невелику кількість етанолу отримують гідратацією етилену та за рахунок інших хімічних процесів. В Україні етиловий спирт одержують з крохмалю злаків та картоплі або ж з цукру меласи (відходи

цукроварень) [23]. Таке паливо отримало назву біоетанолу першого покоління. Проте, подальша експлуатація первинної біомаси для виробництва етанолу створює загрозу достатньому забезпеченню багатьох країн основними продуктами харчування [1].

Альтернативою є етанол другого покоління, який отримують із нехарчової сировини – лігноцелюлози. Використання лігноцелюлози (сухої рослинної біомаси), зокрема ряду сільськогосподарських та енергетичних культур, залишків деревообробної промисловості, а також твердих побутових відходів, є стимулом для успішного впровадження економічно вигідних та екологічно чистих процесів одержання наступних генерацій біопалива [24].

## **1.2. Лігноцелюлоза як альтернативне джерело енергії**

Процес перетворення лігноцелюлози до етанолу є значно складнішим порівняно з процесом отримання етанолу з крохмалю або сахарози [25].

Лігноцелюлозна або рослинна біомаса складається з вуглеводних полімерів (целюлоза та геміцелюлоза), лігніну та невеликої частини кислот, солей та мінеральних речовин. Целюлоза та геміцелюлоза - полісахариди, які зазвичай складають дві третини сухої маси, можуть піддаватися гідролізу і, зрештою, зброджуватися до етанолу [26].

Целюлоза (40-60% сухої біомаси) – це лінійний полімер глюкози. Орієнтація хімічних зв'язків, синдіотактична будова макромолекули й стійкість конформаційної форми ланок роблять її жорсткою і важкодоступною для гідролітичних ферментів.

Геміцелюлоза (20–40%) складається з коротких сильно розгалужених ланцюгів різних цукрів: ксилози, L-арабінози, галактози та манози. Завдяки своїм бічним ланцюгам геміцелюлоза відносно легко гідролізується [27]. Ступінь розгалуження та склад геміцелюлозної фракції залежить від природи та типу рослинної сировини. Однією з найрозповсюдженіших геміцелюлоз є



ксилан, гетерополімер, що складається з залишків ксилози і невеликих кількостей залишків арабінози та глюкуронової кислоти [23].

Лігнін (10-25%) наявний у всій лігноцелюлозній біомасі та не використовується для виробництва етанолу. Це неуглеводна поліфенольна речовина, великий складний полімер фенілпропанових та метоксигруп, що входить до клітинної стінки та утримує клітини разом. Він розкладається лише кількома організмами на продукти більш високої цінності, такі як органічні кислоти, феноли та ванілін [28]. Хоча ці побічні продукти можуть значно підвищити конкурентоспроможність технологій отримання етанолу [29], сучасна промисловість використовує лігнін лише для виробництва електроенергії.

### **1.3. Процес отримання паливного етанолу другого покоління**

Виробництво біоетанолу умовно можна поділити на три послідовні стадії: попередня обробка з делігніфікацією, гідроліз та бродіння [30].

Попередня обробка використовується для видалення лігніну (делігніфікації) та розщеплення структури целюлозної біомаси з метою полегшення подальшого зброджування вивільнених мономерних цукрів. Розроблені різні методи попередньої обробки, але жоден існуючий не відповідає вимогам як з точки зору ефективності, так і вартості. Існує кілька категорій методів попередньої обробки: механічні, хімічні та біологічні.

У хімічній попередній обробці використовують різноманітні хімічні кислоти, луги, органічні розчинники, окислювачі та ферменти для розщеплення лігніну. Серед них попередня обробка розведеною кислотою, аміаком (AFEX) та вапном є особливо ефективними хімічними методами. Кислоти, які використовують, а також інгібітори, які утворюються під час цього процесу, підлягають подальшому видаленню, тобто необхідним є процес нейтралізації та детоксикації для подальшого ефективного зброджування вивільнених цукрів [31, 32, 33, 34].

В останнє десятиліття гідротермальна обробка біомаси за допомогою пари і тепла вважається одним з найефективніших методів попередньої обробки, який характеризується низьким використанням хімікатів і незначним споживанням енергії [35]. Однак, гідролізат містить, крім ферментованих цукрів, широкий спектр сполук, таких як слабкі кислоти, фуранові та фенольні похідні, що інгібують гліколіз дріжджів, алкогольне бродіння та цикл трикарбонових кислот, одночасно виснажуючи внутрішньоклітинний баланс NAD(P)H та АТФ [36]. Крім цього, висока температура сприяє підвищенню кристалічності целюлози, гальмуючи процес гідролізу [37].

На відміну від крохмалю та інших поліцукрів, що легко гідролізуються, основні вуглеводні полімери в рослинній біомасі – целюлоза, геміцелюлоза і, в деяких випадках, пектин, сприяють підтриманню структури та довговічності вегетативних органів рослин [38]. Відповідно до зазначених природних функцій та хімічної будови, використання цих полімерів мікроорганізмами, що здатні руйнувати їх природним шляхом, потребує додаткових технологічних процесів, а саме наступного етапу – гідролізу целюлози та геміцелюлоз до моносахаридів, що може здійснюватися завдяки використанню кислот або ферментів. Для кислотного гідролізу використовують розведену сірчану кислоту або ж концентровану сірчану чи соляну кислоти [4]. Під час гідролізу концентрованими кислотами утворюється менше побічних токсичних продуктів, однак цей процес є досить коштовним і породжує серйозні екологічні проблеми.

Найефективнішим і найперспективнішим методом гідролізу попередньо обробленої лігноцелюлози є ферментативний, який, загалом, не дає жодних токсичних побічних продуктів [20]. Він відбувається за участю целюлаз та геміцелюлаз про- й еукаріотичних мікроорганізмів, головним чином грибів. Найкраще вивчено целюлазний комплекс гриба *Trichoderma reesii* [39]. Впровадженню ферментативного гідролізу в практику заважає кілька чинників, одним з яких є висока ціна. Інший негативний фактор – сильне гальмування ферментативного гідролізу кінцевим продуктом [20].

Оскільки геміцелюлоза є ацетильованою, її повний гідроліз неминуче призводить до вивільнення оцтової кислоти. Забруднення бактеріями під час зберігання біомаси, попередньої обробки та бродіння може додатково збільшити концентрацію оцтової кислоти. Процес отримання біоетанолу з лігноцелюлози зазвичай проводиться при рН 4-5 для протидії забрудненню молочнокислими бактеріями [40]. При цих низьких значеннях рН недисоційована оцтова кислота легко дифундує через плазматичну мембрану дріжджів. Крім цього, супутнє накопичення аніону ацетату в цитозолі може спричинити додаткові ефекти токсичності [36], інгібування анаеробного росту та бродіння.

Для подолання цих негативних наслідків можна здійснювати ферментативний гідроліз (сахарифікацію) водночас і разом з мікроорганізмами, які ферментують вивільнені цукри до етанолу. Показано, що такий процес, який отримав назву одночасна сахарифікація і ферментація (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF), є значно продуктивнішим порівняно з роздільними процесами сахарифікації та ферментації [28, 29]. У даному процесі не спостерігається зворотного інгібування гідролітичних ферментів вивільненими цукрами, оскільки вони одразу засвоюються мікроорганізмами. Додатково цей процес може бути доповнений інтегрованим методом детоксикації, оскільки деякі види дріжджів [41], грибів та бактерій [42] природним чином можуть знешкоджувати інгібіторні сполуки [43, 44]. Показано, що мутантний штам гриба *Trichoderma reesei* розщеплює похідні фурфуролу та оцтової кислоти, штами *E. coli* перетворюють фурфурол у фурфуриловий спирт [43]. Однак, коефіцієнт конверсії цукрів цими мікроорганізмами є низьким, а тривалий час виробничого процесу збільшує ризик забруднення сторонньою мезофільною мікрофлорою.

На сьогоднішній день ефективність SSF процесу для алкогольної ферментації лігноцелюлозної біомаси в промислових масштабах ще остаточно не доведено. Однією з нерозв'язаних проблем на шляху здійснення перетворення лігноцелюлози до етанолу є відсутність мікроорганізмів, здатних до ефективної

конверсії вивільнених цукрів до етанолу при підвищених температурах. Тому, пошуки термотолерантних видів мікроорганізмів, здатних ферментувати основні цукри гідролізатів лігноцелюлози при температурі близько 50 °С, є актуальним завданням.

#### 1.4. Метаболізм ксилози у мікроорганізмів

Для вивільнення цукрів з лігноцелюлозної біомаси застосовують гідроліз, в результаті якого утворюється суміш цукрів – гексоз (переважно з целюлози й геміцелюлози) та пентоз (з геміцелюлози). Після гідролізу в суміші моносахаридів другим за вмістом цукром після глюкози є ксилоза [45, 46]. Вміст ксилози залежить від типу рослинної біомаси і в середньому становить 30% [47].

У процесах промислового виробництва біоетанолу з лігноцелюлозної біомаси зазвичай використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, що здатні ефективно зброджувати гексози. Проте, *S. cerevisiae* природним чином не може ферментувати пентозні цукри, такі як D-ксилоза та L-арабіноза [46]

Серед ксилозоферментуючих мікроорганізмів відомі бактерії *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, дріжджі *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Spathaspora passalidarum*, *Ogataea polymorpha*, *Kluveromyces marxianus* та інші [48, 49, 50].

Потрапивши в клітину, ксилоза перетворюється до ксилулози двома альтернативними шляхами. У бактерій (*Escherichia coli*, *Bacillus coagulans*, *Actinoplanes missouriensis*, *Streptomyces rubiginosus*, *Arthrobacter sp.*), деяких грибів (*Piromyces*, *Orpinomyces*) та рослин (*Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*) наявний фермент ксилозоізомераза, що перетворює ксилозу до ксилулози [38, 51, 52].

На перших етапах метаболізму цієї пентози у ксилозо-ферментуючих дріжджів задіяні два ферменти, що належать до класу оксидоредуктаз [52, 53]. Ксилоза за допомогою ксилоредуктази (КР), яка переважно є NADPH-залежною, відновлюється до ксиліту, який в подальшому окиснюється до

ксилозу за допомогою NAD-залежної ксилітолдегідрогенази (КДГ). Фермента трансгідрогенази, який би перетворював NADH (продукт другої реакції) до NADPH (субстрат першої реакції), у дріжджів немає, що спричиняє дисбаланс кофакторів. Тому в більшості дріжджів, які здатні ферментувати ксилозу до етанолу, внаслідок зазначеного дисбалансу частина ксилози перетворюється до ксиліту, що виділяється у середовище [54].

Ксилулоза на наступному етапі фосфорилується ксилулокіназою (КК) до ксилулозо-5-фосфату, який потрапляє у пентозофосфатний шлях (ПФШ). За участю чотирьох ферментів: транскетолази (ТКЛ), трансальдолази (ТАЛ), рибулозо-5-фосфатпімерази та рибозо-5-фосфатізомерази пентозофосфати (ксилулозо-5-фосфат та рибозо-5-фосфат) перетворюються у фруктозо-6-фосфат та гліцеральдегід-3-фосфат, які надходять у гліколіз. У гліколітичному шляху гліцеральдегід-3-фосфат після кількох реакцій перетворюється у піруват, який за аеробних умов окиснюється до ацетил-КоА та надходить у цикл трикарбонових кислот, або за анаеробних умов через ацетальдегід, перетворюється до етанолу (Рис. 1.1) [23].

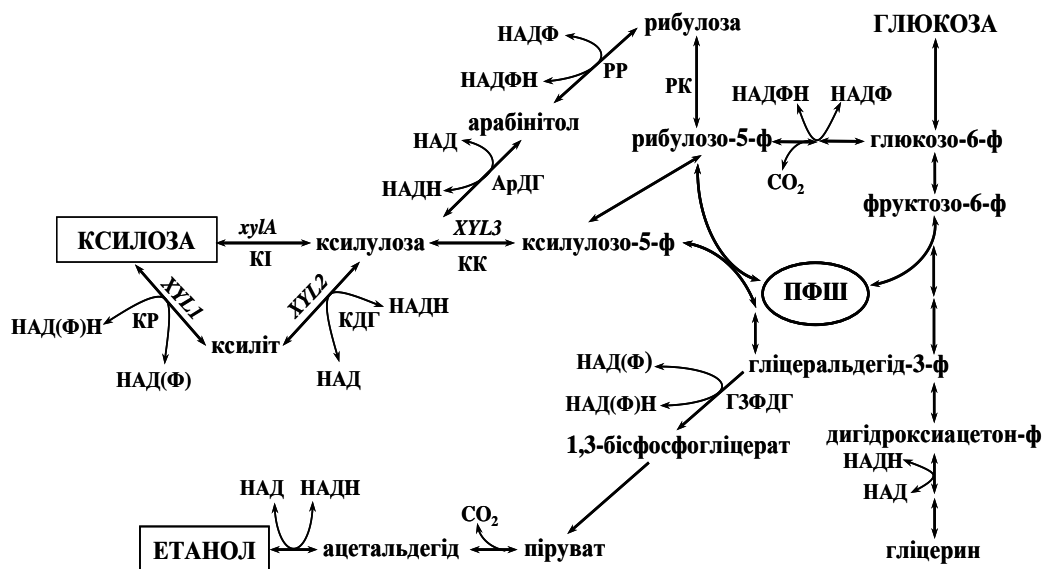


Рис.1.1. Шлях метаболізму ксилози у дріжджів та бактерій [55]; КР – ксилоредуктаза, КДГ – ксилітолдегідрогеназа, КІ – ксилозоізомераза, КК –

ксилокіназа, АрДГ – арабінітолдегідрогеназа, РР – рибулозоредуктаза, РК – рибулокіназа, ГЗФДГ – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа.

Складний шлях перетворення ксилози до етанолу обумовлює виникнення чинників, які лімітують ефективність процесу алкогольної ферментації цієї пентози, а саме: інгібування транспорту ксилози в клітину при наявності глюкози; дисбаланс кофакторів, що виникає внаслідок різної кофакторної специфічності ферментів КР та КДГ, та утворення побічного продукту ксиліту; низький рівень експресії КК та ферментів неокисної ланки ПФШ [51, 56, 57].

За допомогою додаткових генетичних модифікацій в дріжджах *S. cerevisiae*, зокрема, експресії гетерологічних генів, залучених на перших етапах катаболізму ксилози, посилення експресії генів ферментів пентозофосфатного шляху [58, 59, 60, 61], делеції гена *GRE3* [60, 62] і гена *PMR1* [63] та багатьох інших генів, було здійснено спроби подолати чинники, які лімітують процес алкогольної ферментації ксилози, з метою створення ефективних продуцентів етанолу з гідролізатів лігноцелюлози.

#### **1.4.1. Транспорт глюкози та ксилози у дріжджів**

Протягом останнього десятиліття велику увагу дослідники приділяють вивченню транспорту пентоз, оскільки він є першим та одним з лімітуючих етапів їх подальшого ефективного перетворення в клітинах мікроорганізмів. У дріжджів транспортування цукрів відбувається за участі білків, що входять до найбільшої серед основних родин транспортерів (Major Facilitator Superfamily, або MFS) і включають білки бактерій, архей та еукаріотів з високим рівнем структурно-функціональної схожості [64]. У дріжджів багато моносахаридних транспортерів працюють за допомогою полегшеної дифузії, енергонезалежного механізму, який врівноважує концентрацію моносахаридів у цитоплазмі та в позаклітинному середовищі [65].

Транспорт глюкози в *S. cerevisiae* здійснюється родиною Hxt транспортерів [6, 66], а саме: Hxt1 [9], Hxt2 [7, 71], Hxt3 [8], Hxt4, Hxt5, Hxt7 [71], Hxt11 [7] та галактозною пермеазою Gal2 [67, 72]. Ці транспортери забезпечують полегшену дифузію гексозних цукрів і зазвичай є низькоафінними. Штам *S. cerevisiae*, в якому були видалені основні гени транспортерів *HXT1-17* та *GAL2*, не ріс на глюкозі [6]. Аналогічний штам з делеціями лише генів основних гексозних транспортерів *HXT1-7* та *GAL2* характеризувався незначним ростом на глюкозі [68, 73, 74].

У експериментальних підходах для збільшення транспорту ксилози у *S. cerevisiae* використовують два різні ксилозо-утилізуючих штами. Перший штам із делецією гексокінази, який не здатний фосфорилувати глюкозу і, отже, не може використовувати її для росту. Такі дріжджі необхідні для відбору штамів з покращеним транспортом ксилози у присутності високих концентрацій глюкози [7, 8, 72, 75, 76]. Інший штам із делецією транспортерів гексоз, в якому відсутні основні або навіть усі Hxt-транспортери. Через неможливість транспортувати пентози такі штами не ростуть на ксилозі, проте, можуть використовуватись для експресії конкретних транспортерів та відбору мутантів з покращеним ростом на ксилозі [75, 77]. В результаті отримують різні мутації в ендогенних транспортерах, які або сприяють поліпшенню транспорту ксилози, або зменшують чутливість до конкурентного інгібування глюкозою.

Залишки аспарагіну у положеннях 366, 367, 370 та 376 у Hxt1 [7], Hxt7, Gal2 [72] та гібридному Hxt36, отриманому шляхом злиття перших 438 амінокислот Hxt3 та останніх 130 з Hxt6 [8], відповідно, були замінені на різні амінокислоти, в результаті чого виявлено, що всі вони викликали знижену спорідненість до глюкози і в деяких випадках покращували спорідненість до ксилози. У Gal2 мутація N376F повністю пригнічувала поглинання глюкози, тоді як спорідненість до ксилози зростала [72]. Мутація N367A в Hxt36 підвищувала спорідненість до ксилози, але із зниженою максимальною швидкістю поглинання. Мутант Gal2 N376Y, отриманий за допомогою ПЛР з помилками,

після введення мутації M435I характеризувався зростанням швидкості поглинання ксилози за наявності чотирьохкратного надлишку глюкози [72].

У *S. cerevisiae*, як і у багатьох інших видів дріжджів, глюкоза забезпечує власний метаболізм, слугуючи стимулом, який регулює кількість, види та активність транспортерів Hxt, як на рівні транскрипції, так і на посттрансляційному рівні. Транспортери Hxt відрізняються своєю спорідненістю до глюкози [68], і відповідно їх експресія та деградація регулюється різною концентрацією глюкози [69]. Hxt1 і Hxt3 – транспортери глюкози низької афінності [68], активуються за високих концентрацій глюкози [70] і деградують за її зниження [9, 78]. Важливою передумовою покращення споживання ксилози низькоафінними транспортерами глюкози є запобігання їх деградації, коли рівень глюкози низький. З цією метою здійснювали заміну амінокислотних залишків лізину в транспортерах Hxt1, Hxt5 та гібридному Hxt3b на залишки аргініну [9], оскільки залишки лізину є об'єктом убіквітинування – одного із основних сигнальних шляхів для деградації низькоафінних транспортерів [9, 72, 75, 77, 78]. Показано, що лише у мутантів Hxt3b спостерігалось покращене бродіння ксилози, яке, ймовірно, пов'язане з підвищеною стабільністю Hxt [9].

Hxt2, Hxt6 і Hxt7 є транспортерами глюкози з високою афінністю, які [68] активуються в середовищах із обмеженою кількістю глюкози або її повною відсутністю [70, 79] й деградують при високих концентраціях глюкози [78, 81]. Hxt4 і Hxt5 є транспортерами середньої афінності до глюкози. Hxt4 експресується при більш низьких концентраціях глюкози [79], тоді як Hxt5 в основному індукується під час зниження росту та на неферментативних вуглецевих субстратах [80]. Про деградацію Hxt4 відомо мало, але Hxt5 стабільно залишається в мембрані при низьких концентраціях глюкози [9].

Ефективним підходом отримання мутантів специфічних до поглинання ксилози, які можна додатково адаптувати шляхом спрямованого мутагенезу, є еволюційна інженерія дріжджових транспортерів цукрів, що базується на



довготривалому культивуванні [65]. Еволюційний підхід із використанням мутантів *S. cerevisiae* без основних Hxt-транспортерів виявив експресію криптичного гена *HXT11* [7]. Посилення експресії *HXT11* в штамі *S. cerevisiae* з делецією генів *HXT1-7* та *GAL2* обумовлювало поліпшення росту на ксилозі. Секвенування геномів штамів після довготривалого культивування на середовищі з ксилозою виявило, що у більшості випадків покращення параметрів алкогольної ферментації ксилози є наслідком посилення експресії генів, що кодують КР, внаслідок збільшення копійності або точкових мутацій, які підвищують її активність [82]. Підвищення продуктивності алкогольної ферментації також спостерігалось внаслідок еволюційної інженерії на середовищі з додаванням гідролізатів лігноцелюлози [83]. Делеція гексокінази в геномі мутанта з точковою заміною N366T в Hxt11 дозволила отримати штамі, що може рости на ксилозі в присутності дуже високих концентрацій глюкози із збереженням високої швидкості транспортування пентоз. Зокрема, завдяки високій швидкості транспортування ксилози, мутант Hxt11 N366T був здатний одночасно зброджувати ксилозу та глюкозу [7]. Ще одна перевага Hxt11 полягає в тому, що цей криптичний транспортер стабільно залишається в плазматичній мембрані без будь-яких ознак деградації при високих концентраціях глюкози [7, 81] на відміну від Hxt2 [81, 84] та Hxt7 [78, 85].

За допомогою мутації глюкозочутливого ко-репресора *Suc8*, що викликає загальну регуляцію практично всіх генів *HXT* одночасно з покращенням транспорту ксилози було створено мутанти специфічні до поглинання пентоз [85, 86, 87].

Розглядаються й кілька метаболічних стратегій досягнення спільного споживання цукрів, проте, обсяги поглинання ксилози в цих випадках залишаються низькими, головним чином через деградацію залежної від глюкози системи транспорту. За допомогою відповідної стратегії для поліпшення спільного споживання ксилози та глюкози отримано різні мутації гексокіназ – фосфорилюючих ферментів глюкози (Hxk1, Hxk2 та Glk1) [88]. Крім цього,

одночасна утилізація ксилози та глюкози була досягнута шляхом видалення генів, що кодують глюкозо-6-фосфатізомеразу (*PGII*) та рибулозо-5-фосфатепімеразу (*RPE1*) у ксилозо-ферментуючого штаму *S. cerevisiae* [65].

Альтернативним способом покращення ефективності транспорту ксилози у *S. cerevisiae* є експресія гетерологічних транспортерів з високою спорідненістю до ксилози. Гетерологічно експресовані транспортери ксилози мають вищу спорідненість до пентоз, однак транспорт зазвичай відбувається з низькою швидкістю. Додатково виникає проблема стабільності пентозних транспортерів. Експресія двох транспортерів CiGxf1 та CiGxs1 із штаму *Candida intermedia* РУСС 4715 сприяла підвищенню швидкості споживання ксилози у *S. cerevisiae* [41, 89, 90]. Експресія генів At5g59250 / At5g17010, що кодують транспортери цукру в *A. thaliana* та описані як гомологи транспортерів ксилози у *S. cerevisiae* обумовлювала покращення споживання глюкози та ксилози [91]. Експресія гена *SUT1*, що кодує транспортер цукрів у *S. stipitis*, у штамі *S. cerevisiae* підвищувала як здатність до поглинання ксилози, так і продукцію етанолу під час ферментації ксилози. Аналогічний ефект спостерігався і для глюкози [91, 92]. Експресія транспортерів Xut1 і Xut3 *S. stipitis*, що характеризуються високою афінністю до ксилози, в штамі *S. cerevisiae* (*hxt1-7Δ* та *gal2Δ*) відновлювала його ріст на ксилозі [93]. Крім цього, введення мутації E538K у SsXut3 покращило спорідненість до ксилози, а також дозволило підвищити ріст штаму при низьких концентраціях ксилози [94]. Проте, ці транспортери не є специфічними для ксилози і здатні транспортувати також глюкозу [95].

Транспортер Mgt05196 був виділений з *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* – дріжджів, що метаболізують і забезпечують високу швидкість транспортування ксилози. Мутації F432A та N360S в Mgt05196 обумовлювали підвищення здатності транспортувати ксилозу. Крім того, мутація N360F в Gal2 [72], зробила транспортування ксилози нечутливим до інгібування глюкозою [96].

Описані вище підходи покращували здатність одночасного споживання ксилози та глюкози за умов алкогольної ферментації. Проте, досягнення

промислових масштабів виробництва етанолу та налагодження рентабельних умов дотепер залишається невирішеною проблемою.

#### **1.4.2. Метаболічна інженерія термотолерантних дріжджів *Ogataea polymorpha* з метою подолання лімітуючих етапів катаболізму ксилози**

*Ogataea polymorpha* – термотолерантні метилотрофні дріжджі, здатні здійснювати алкогольну ферментацію ксилози при температурі близько 50 °C та є зручним об'єктом для промислового виробництва, оскільки толерантність до високих температур може зменшити витрати на охолодження ферментерів та ризик їх забруднення. Крім цього, для них добре розроблено методи класичної і молекулярної генетики [97] та відома повна послідовність геному [98].

Штами дикого типу *O. polymorpha* здатні ферментувати глюкозу, ксилозу, манозу, мальтозу та целобіозу, але вони не здатні утилізувати та зброджувати галактозу та L-арабінозу [99]. Проте, ефективність перетворення ксилози до етанолу природними штамами *O. polymorpha* є досить низькою. Для підвищення ефективності ферментації ксилози цього виду дріжджів було застосовано різні підходи метаболічної інженерії.

Висока толерантність до етанолу – одна з важливих особливостей продуцентів етанолу для промислового використання. *O. polymorpha* є більш стійкими до етанолу ніж *S. stipitis*, але більш чутливими ніж *S. cerevisiae* [100]. Надекспресія ендогенного гена *ETT1* (гомолог гена *S. cerevisiae MPE1*) значно підвищувала стійкість *O. polymorpha* до етанолу. Підвищення толерантності *O. polymorpha* до етанолу також було досягнуто шляхом гетерологічної експресії гена *MPR1 S. cerevisiae*, що кодує N-ацетилтрансферазу [101].

Відомо, що подібно до інших грибів, *O. polymorpha* накопичує трегалозу та експресує білки теплового шоку (Hsps) [102]. Збільшення внутрішньоклітинного рівня трегалози в *O. polymorpha* внаслідок делеції гена *ATH1*, що кодує кислу

трегалазу, сприяло шестикратному підвищенню продукції етанолу під час бродіння ксилози при 50°C [103].

Додатковим лімітуючим чинником є дисбаланс кофакторів на перших етапах катаболізму ксилози, яка відновлюється за допомогою NADPH-залежної ксилоредуктази (КР) з наступним окисненням ксиліту до ксилулози за допомогою NAD-залежної ксилітолдегідрогенази (КДГ). Щоб уникнути дисбалансу кофакторів було делетовано гени *XYL1* (кодує КР), паралогів *XYL2-A* та *XYL2-B* (кодують ізозими КДГ) у штамі CBS4732, що призвело до втрати здатності метаболізувати ксилозу. Експресія бактерійних генів *xylA*, що кодують КІ *E. coli* та *Streptomyces coelicolor*, відновлювала здатність делеційних штамів рости і ферментувати ксилозу, проте продукція етанолу залишалася дуже низькою (0,15 г/л). Посилення експресії гена *xylA E. coli* та нативного гена *XYL3*, що кодує КК *O. polymorpha*, підвищувало продуктивність алкогольної ферментації до 0,6 г/л при 48°C [104].

Інший напрямок досліджень стосувався білкової інженерії КР з метою зменшення спорідненості фермента до NADPH, як це було успішно здійснено для *Candida tenuis* [105]. Посилення експресії модифікованої КР та нативних КДГ і КК в геномі штаму CBS4732 підвищувало продукцію етанолу в 2 рази, досягаючи 1,3 г/л. Штам дикого типу NCYC495 *O. polymorpha* характеризується утворенням суттєво вищої кількості етанолу ніж штам CBS4732 *C. tenuis* [106].

Піруватдекарбоксилаза (ПДК) є одним з ключових ферментів кінцевих стадій алкогольного бродіння, що каталізує перетворення пірувату до ацетальдегіду та CO<sub>2</sub>. Згодом ацетальдегід відновлюється до етанолу алкогольдегідрогеназою (АДГ), що кодується геном *ADH1*. Мультикопійна інтеграція *PDC1* в геном штаму NCYC495 приводила до 20-кратного зростання активності ферменту та підвищення продукції етанолу в 3 рази. Надекспресія генів *PDC1* та *ADH1* в *O. polymorpha* додатково покращувала параметри спиртового бродіння ксилози порівняно зі штамом, що містив виключно *PDC1*. Крім того, для збільшення продукції етанолу на основі штаму NCYC495 за

допомогою УФ - мутагенезу було отримано мутант 2EthOH<sup>-</sup>, що не здатний використовувати етанол як вуглецевий субстрат. Посилення експресії гена *PDC1* в геномі мутантного штаму 2EthOH<sup>-</sup> підвищило продукцію етанолу з ксилози до 2,5 г/л [106, 107].

Штами з надекспресією генів *XYL1m*, *XYL2* і *XYL3* в геномі 2EthOH<sup>-</sup> мутанта, селекціоновані на середовищі із токсичними концентраціями 3-бромпірувату (BrPA), характеризувалися збільшенням продукції етанолу з ксилози (до 10 г/л при 45 °С) [12]. BrPA – токсична сполука, що викликає зниження рівня АТФ за рахунок пригнічення гліколітичних ферментів, гексокінази II, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази та 3-фосфогліцераткінази [108]. У результаті інсерційного мутагенезу *O. polymorpha* NCYC495 встановлено, що інсерційна касета пошкодила ORF (відкрита рамка зчитування) гена, що виявляє високий відсоток подібності до гена *ATG13 S. cerevisiae*, пов'язаного з аутофагією [109]. Ця мутація обумовлювала до 40% збільшення продукції етанолу з ксилози у порівнянні з батьківським штамом. Однак, механізм залучення гена *ATG13* в процес утворення етанолу з ксилози залишається невідомим.

Подальшому покращенню продукції етанолу з ксилози в *O. polymorpha* за допомогою підходів метаболічної інженерії перешкоджає відсутність знань про регуляцію метаболізму і ферментації ксилози. Гомолог гена *CAT8 S. cerevisiae*, який кодує транскрипційний фактор, залучений в регуляцію щонайменше 30 генів, що беруть участь у глюконеогенезі, утилізації етанолу, гліоксалатному циклі, був виявлений в геномі *O. polymorpha*. Встановлено, що делеція гена *CAT8* не приводила до значних змін у продукції етанолу з глюкози, проте значно покращувала утворення етанолу з ксилози [5].

Найкращі наявні на сьогодні продуценти етанолу з ксилози дріжджів *O. polymorpha* [5, 110], утворюють майже 12,5 г/л етанолу з ксилози при 45°C. Це в 20 разів перевищує продукцію етанолу штамом дикого типу, але все ж поступається рекомбінантним штамам *S. cerevisiae* та *S. stipitis*, які, однак, є

мезофільними мікроорганізмами. Втім, для отримання етанолу з гідролізатів лігноцелюлози в промислових масштабах необхідним є подальше вдосконалення найкращих на даний момент штамів дріжджів *O. polymorpha*.

#### **1.4.3. Роль пероксисомних ферментів в метаболізмі ксилози у метилотрофних дріжджів**

Пероксисоми – це універсальні органели, які містять ферменти, що каталізують численні катаболічні та деякі біосинтетичні реакції. Подібно до інших організмів пероксисоми дріжджів містять оксидази і каталази, що розщеплюють утворений гідроген пероксид. Ферменти β-окиснення жирних кислот і гліоксалатного циклу асоційовані з пероксисомами дріжджів [111]. Ферменти, залучені у метаболізм таких нетрадиційних джерел Карбону і Нітрогену як метанол, n-алкани, пурини, D-амінокислоти, метиламін, етиламін, піпеколінова кислота, саркозин, гліколат, спермідин, також мають пероксисомну локалізацію в клітинах дріжджів. Такі субстрати Карбону, у свою чергу, діють як проліфератори пероксисом і викликають збільшення їхніх розмірів і кількості [112].

До недавнього часу вважали, що ферменти катаболізму глюкози (тобто, гліколізу та пентозофосфатного шляху) дріжджових та міцелійних грибів розташовані в цитозолі [113]. Однак, останні дослідження щодо *Cryptococcus neoformans* та *Ustilago maydis* показали, що деякі гліколітичні ферменти виявляють подвійну локалізацію у цитозолі та в пероксисомах [114]. У *Candida albicans* та споріднених видів встановлена цитозольна та пероксисомна локалізація ферментів окисної стадії пентозофосфатного шляху, а саме глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та 6-фосфоглюконатдегідрогенази [115]. І цитозольні, і пероксисомні форми цих білків кодуються тими самими генами, що дозволяє припустити, що подвійна локалізація ферментів є результатом альтернативного сплайсингу або рибосомного зчитування стоп-кодонів [114]. Однак, метилотрофні дріжджі, *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), містять два

набори ферментів неокисної стадії пентозофосфатного шляху. Це цитозольні та пероксисомні ізоформи, кодовані різними паралогами [116].

Метилотрофні дріжджі містять пероксисомну транскетолазу, відому також як дигідроксиацетонсинтаза (ДАС), що бере участь в засвоєнні формальдегіду під час росту на метанолі, каталізуючи реакцію між ксилулозо-5-фосфатом та формальдегідом [117], а також пероксисомну трансальдолазу (ТАЛ), фермент, що каталізує конденсацію седогептулозо-7-фосфату та гліцеральдегід-3-фосфату. Встановлено, що ДАС *O. polymorpha* може функціонувати як неспецифічна транскетолаза, використовуючи замість формальдегіду як акцептор глікоальдегідного залишку ксилулозо-5-фосфат [118].

### **1.5. Глутатіон та його біотехнологічне виробництво**

Глутатіон (L-γ-глутаміл-L-цистеїнілгліцин, GSH) – трипептид, що є найпоширенішим низькомолекулярним тіолом. Цей антиоксидант рівномірно розподіляється всередині клітини, проте більша частина загальної кількості GSH (близько 90%) зберігається в цитозолі. Решта фракції GSH присутня в мітохондріях, ядрі та ендоплазматичному ретикулюмі [120]. В еукаріотичних клітинах, його концентрація коливається від 0,2 до 10 мМ. Відносно низькі концентрації GSH можуть бути виявлені також у позаклітинному просторі. В клітині GSH може бути присутній у трьох основних формах: відновленій (GSH), окисненій – глутатіондисульфід (GSSG) та змішаній – білок-глутатіондисульфід (PSSG). Глутатіондисульфід виникає внаслідок окиснення сульфгідрильної групи GSH і утворення дисульфідного зв'язку між двома молекулами GSH [121].

У фізіологічних умовах відновлена форма становить близько 90%, що є можливим за рахунок функціонування NADPH-залежної глутатіонредуктази (GR) та тіоредоксину ( $\text{Trx}(\text{SH})_2/\text{TrxSS}$ ), які визначають окисно-відновний стан у біологічних системах. Крім збереження внутрішньоклітинного окисно-відновного потенціалу, GSH має багато й інших важливих функцій. Глутатіон зберігає більшу частину внутрішньоклітинного цистеїну і модулює активність

білків, впливаючи на проходження клітинного циклу, загибель клітин, активність факторів транскрипції та сигнальних шляхів. Також цей механізм виконує функцію захисту білків від оксидативного стресу чи шоку спричиненого голодуванням, ксенобіотиками та важкими металами [120, 122, 123].

Наявність залишку цистеїну дозволяє окиснювати GSH до GSSG як неферментативно за допомогою вільних радикалів кисню, так і ферментативно, за участі родини глутатіонпероксидаз (GPxs) [124, 125]. Більше того, глутатіон необхідний для активності глутатіон-S-трансферази (GSTs), що бере участь у детоксикації ксенобіотичних субстратів або продуктів оксидативного стресу, а також GSH-залежного каталізу глутаредоксину (GRx), який руйнує дисульфідні субстрати з утворенням GSSG [122, 126]. Зміна гомеостазу GSH має значний вплив на фізіологічний стан клітини і часто спостерігається при патологічних станах, включаючи діабет, нейродегенеративні розлади та рак [127, 122, 124].

GSH і GSSG широко застосовуються в медичній, косметичній та харчовій промисловості як активний компонент лікарських, харчових та косметичних засобів, для зменшення окисних процесів та знешкодження токсичних сполук [128, 129, 130]. Істотне значення глутатіон має як допоміжний препарат у терапії раку. Якщо врахувати значну роль ROS у розвитку пухлини та її прогресуванні, глутатіон та антиоксиданти можуть проявляти подвійну роль, захищаючи клітинний гомеостаз від неопластичних окисних пошкоджень або сприяючи прогресуванню раку, уникаючи активації шляхів загибелі клітин [131]

Глобальний ринок глутатіону в 2019 році оцінювався в 1,0 млрд. дол. США, і, як очікується, за оцінками одного із найбільших виробників глутатіону у світі – KYOWA HAKKO BIO CO., LTD (<http://www.kyowahakko-bio.co.jp/english/>) до 2027 року він досягне 2,6 млрд. дол. США. Протягом прогнозованого періоду показник CAGR (сукупній середньорічний темп зростання об'ємів виробництва) складе 12,69%. Орієнтовне щорічне виробництво чистого кристалічного глутатіону, отриманого переважно за допомогою дріжджів, та збагаченого



глутатіоном дріжджового екстракту (15% GSH) перевищує 200 та 800 тонн, відповідно. Це доводить велике комерційне значення глутатіону.

Для отримання GSH раніше використовували тканини тварин або рослин. Однак, відносно низький вміст внутрішньоклітинного GSH обумовлював суттєву вартість кінцевого продукту, що перешкоджало практичному застосуванню цього підходу. Таким чином, для промислового виробництва глутатіону почали використовувати інші методи, а саме: 1) хімічний синтез; 2) ферментативний синтез *in vitro* та 3) синтез *in vivo* мікроорганізмами-продуцентами.

Більше 80 років тому для хімічного синтезу GSH було використано модифіковану версію методу із бензилкарбонатом [132]. Хоча цей процес був комерціалізований у 1950-х роках, проте, не був впроваджений в масштабне промислове виробництво через його складність. Більше того, кінцевий продукт являв собою оптично неактивну (рацемічну) суміш D- та L-ізомерів. Оскільки тільки L-ізомер є фізіологічно активним, для їх розділення необхідні додаткові процеси сепарації, що підвищує вартість процесу. Саме тому, хімічний синтез нині майже не застосовується для промислового виробництва GSH.

Одним з добре вивчених підходів для отримання GSH є ферментативний синтез *in vitro*. Для цього методу використовують або вільні, або іммобілізовані ферменти. В біореактор також додають амінокислоти-попередники: L-глутамінову кислоту, L-цистеїн, L-гліцин, а також ATP і  $Mg^{2+}$ . Останній є кофактором для двох реакцій біосинтезу GSH. Використовують ферменти різних мікроорганізмів (*S. cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*). Залежно від природи ферменту умови процесу можуть змінюватися [133].

Перевага ферментативного виробництва полягає в тому, що можна досягти відносно високих концентрацій GSH (до 9 г/л) без побічних продуктів, що значно знижує вартість процесів [133]. Проте, внаслідок високої вартості попередників, ферментативний метод виробництва GSH на сьогоднішній день є менш затребуваним ніж процеси із використанням мікроорганізмів-продуцентів [134].

Висока концентрація GSH присутня в бактерії *E. coli* та *Lactococcus lactis*, а також ціанобактерій та пурпурових фотосинтетичних бактерій, оскільки припускають, що GSH з'явився, коли на землі виникла достатня кількість кисню [135]. Втім, для промислового виробництва найчастіше використовують дріжджі *S. cerevisiae* та *Candida utilis*. Перевагою цих дріжджів є здатність, природним чином накопичувати високі концентрації внутрішньоклітинного глутатіону, що становить 0,1–1,0% від сухої маси клітин [136].

### **1.6. Метаболізм глутатіону у клітинах дріжджів та регулювання його продукції й деградації**

Синтез GSH відбувається в цитозолі за рахунок двох АТФ-залежних ферментативних реакцій. Перший і обмежувачий етап – конденсація цистеїну з глутаматом з утворенням дипептиду  $\gamma$ -глутамілцистеїну за участю  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетази ( $\gamma$ -GCS, також відомої як глутамат-цистеїнова лігаза – GCL, Gsh1 в еукаріот і GshA у прокариот), що кодується геном *GSH1* (Рис. 1.2) і *gshA* відповідно. В *O. polymorpha* гомолог гена *S. cerevisiae* *GSH1* отримав назву *GSH2* [14]. GCS дріжджів та бактерій представлена єдиним поліпептидним ланцюгом [142]. Проте, у плодових мух, гризунів та людини складаються з каталітичної (GCLC) та регуляторної (GCLM) субодиниць. GCLC проявляє каталітичну активність і піддається зворотньому інгібуванню глутатіоном. GCLM є ферментативно неактивною, але підвищує активність GCLC [143, 144]. ScGCL виявляє гомологію до каталітичної субодиниці ферменту людини (hGCLC) [145]. На другому етапі за участю  $\gamma$ -глутамілцистеїнглїцинлігази (глутатіонсинтетаза, GS, Gsh2 в еукаріот і GshB в прокариот), що кодується геном *GSH2* у *S. cerevisiae* та інших еукаріот, глїцин приєднується до  $\gamma$ -глутамілцистеїну з утворенням глутатіону (Рис. 1.2).

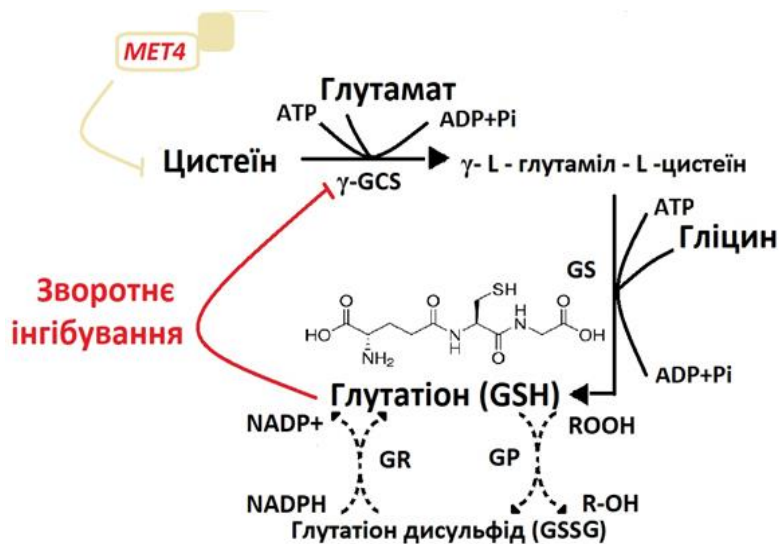


Рис. 1.2. Схема біосинтезу глутатіону

В бактерійних клітинах [146, 147] було виявлено єдиний біфункціональний фермент GS (GshF, що кодується геном *gshF*), здатний здійснювати синтез GSH без зворотного інгібування глутатіоном [148]. Концентрація амінокислот-попередників (глутамат, цистеїн та гліцин) та ATP є визначальними факторами синтезу глутатіону в клітині. Однак більш вагомий вплив на продукцію глутатіону має рівень експресії генів *GSH1* та *GSH2*, а також активність відповідних ферментів [136].

Штами дріжджів *S. cerevisiae*, в яких делетований перший ген біосинтезу GSH, не здатні рости за відсутності трипептиду у середовищі, що свідчить про життєву необхідність цього метаболіту. Лімітуючим в процесі біосинтезу є  $\gamma$ -GCS, що підлягає зворотному інгібуванню на рівні ферменту кінцевим продуктом синтезу, тобто GSH. Таким чином, незначне зниження вмісту GSH в клітині призводить до послаблення зворотного інгібування  $\gamma$ -GCS, підвищення експресії гена *GSH1* під впливом транскрипційних факторів і посилення синтезу трипептиду [149]. GSH виступає конкурентним інгібітором по відношенню до L-глутамату (Glu). Вважають, що глутаматний залишок глутатіону, в активному центрі ферменту. Однією з важливих відмінностей між комплексами ScGCL-Glu та ScGCL-GSH є втрата сайту для  $Mg^{2+}$ - зв'язуючого кофактора. Без участі координаційних іонів магнію GSH в активному центрі зміщується у нижню

частину активного сайту, що обмежує взаємодію АТР або АDP. Мутації у цьому залишку призводять до втрати спорідненості до субстрата. Крім цього, активність  $\gamma$ -GCS контролюється транскрипційними факторами, а структура білка піддається пострансляційним модифікаціям. Встановлено, що транскрипційна регуляція гена *GSH1* у *S. cerevisiae* відбувається під дією двох транскрипційних активаторів Yap1 і Met4, які беруть участь у і асиміляційних шляхах сірки [149].

Yap1 – транскрипційний фактор, який регулює експресію багатьох генів, що забезпечують синтез антиоксидантних речовин в клітині і обумовлюють їх стресостійкість [150]. За нормальних умов цей білок виявляється в цитоплазмі, але в умовах оксидативного стресу швидко акумулюється в ядрі клітини, де індукуює експресію генів, що кодують антиоксидантні білки. Встановлено, що промотори генів *GSH1* та *GSH2* *S. cerevisiae* містять схожі послідовності для зв'язування Yap1, тому вважається що їх регуляція відбувається подібно [151].

Експресія *GSH1* потребує також Met4 транскрипційного фактора. Met4 – транскрипційний активатор, який регулює асиміляцію позаклітинного сульфату. Таким чином, він має непрямий вплив на біосинтез GSH, регулюючи надходження цистеїну в клітину. Встановлено, що у *S. cerevisiae* Met4 не має ДНК-зв'язуючого домену, але може приєднуватися до промотора гена у формі гетеромерного комплексу, який включає Met28, що є фактором з лейциновою застіркою (bZip фактором), та Cbf1, який є фактором з доменом типу спіраль-петля-спіраль [149]. В умовах дефіциту GSH Met4 взаємодіє з Cbf1, що викликає Yap1- опосередковану активацію експресії першого гена біосинтезу трипептиду. За наявності метіоніну Met4 підлягає процесу убіквітинування, тому Cbf1 репресує Yap1-опосередковану активацію *GSH1* [151]. Цей механізм є відмінним від *GSH1* відповіді на оксидативний стрес, яка є Met4 незалежною.

На відміну від *S. cerevisiae*, у метилотрофних дріжджів механізм регуляції біосинтезу GSH та забезпечення його гомеостазу у клітині залишаються в багатьох аспектах недостатньо вивченим. Дослідження присутності

регуляторних елементів в структурі гена *HpGSH2*, який відповідає за синтез першого фермента біосинтезу GSH у *O. polymorpha*, показало наявність YRE сайтів, що у *S. cerevisiae* розпізнаються Yap1 транскрипційним активатором, а також OSRE сайти (oxidative stress response elements), які залучені у відповідь на оксидативний стрес та розпізнаються Skn7 транскрипційним фактором. Промоторна ділянка гена містить також XRE (xenobiotic response elements), що активуються дією ксенобіотиків та знайдені в клітинах деяких ссавців і *S. cerevisiae* в структурі генів глутатіонтрансфераз (гени *GST* та *GTT*, відповідно). Також виявлені потенційні CDEI-зв'язуючі сайти, залучені в експресію *GSH1* гена *S. cerevisiae* під дією іонів кадмію за участю комплексу Cbf1 та Met4 транскрипційних факторів [144, 152].

Посилена експресія генів *GSH1* та *GSH2* була першою спробою поліпшити біосинтез глутатіону. Однак у більшості досліджень це не призвело до значного підвищення його вмісту в клітині [136]. Отриманий результат пов'язаний із негативною регуляцією першого гена біосинтезу глутатіону кінцевим продуктом або виведенням надлишку трипептиду та його деградацією. Підвищення внутрішньоклітинного вмісту глутатіону було досягнуто, також, завдяки надекспресії аденілсульфат-кінази (*MET14*) та редуктази PAPS (*MET16*), генів, що беруть участь у шляху асиміляції сульфату [138]. Крім цього, описано кілька стратегій відбору надпродуцентів глутатіону, використовуючи фізичні або хімічні способи мутагенезу (УФ, рентгенівське випромінювання,  $\gamma$ -випромінювання та N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, а також високотоксичні сполуки: етіонін, 1,2,4 -тріазол та ціанід натрію) [133, 139]. Підвищення вмісту внутрішньоклітинного глутатіону у неконвенційних дріжджів *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) та *O. polymorpha* було досягнуто за допомогою генної інженерії [140, 141].

Окрім регуляції цитоплазматичного синтезу, гомеостаз GSH контролюється шляхом деградації та процесами імпорту або експорту з клітини [122]. Вважається, що у про- та еукаріотичних організмів деградація GSH відбувається

лише на плазматичній мембрані, де локалізується фермент  $\gamma$ -глутамілтранспептидаза ( $\gamma$ GT, GGT) [153]. Проте, також було виявлено відповідні ферменти в цитоплазмі бактерій. GGT здатні розщеплювати GSH, GSSG та різні  $\gamma$ -глутамілові субстрати (наприклад, кон'югати GSH-S). Активний сайт GGT знаходиться за межами клітини, таким чином він може взаємодіяти із GSSG або GSH лише тоді, коли вони потрапляють в позаклітинне середовище через відповідні транспортери [154].

Альтернативний шлях деградації цитозольного GSH, який не залежить від  $\gamma$ -глутамілтранспептидази, був ідентифікований у *S. cerevisiae* [155]. Цей так званий DUG шлях, що містить три металопротеїни Dug1, Dug2 та Dug3 [156]. Dug1 каталізує гідроліз Cys-Gly до цистеїну та гліцину. Делеція гена *DUG1* призводила до внутрішньоклітинного накопичення Cys-Gly із супутнім підвищенням токсичності GSH. Dug2 і Dug3 утворюють гетеродимерний Dug-фермент, каталізуючи деградацію GSH до глутамату та Cys-Gly. Було показано, що гени *DUG2* і *DUG3* репресуються за умов нестачі сірки [157].

Ідентифіковано кілька нових ферментів, здатних до деградації GSH. Це фермент ChaC1, знайдений серед вищих еукаріотів, фермент ChaC2, виявлений у всіх живих організмів, і фермент RipAY, представлений у деяких бактерій [157, 158, 159]. В процесі деградації GSH, рівень  $\gamma$ -глутамілтранспептидази знижується, забезпечуючи клітини глутаматом, який надалі буде перетворений на інші азотовмісні сполуки, необхідні для біосинтетичних процесів [160, 161, 162].

Ендогенний глутатіон за нормальних умов росту дріжджів та у відповідь на надмірний оксидативний стрес може виводитись із клітин за допомогою Gex1p антипортера [163, 164], однак, за рахунок транспортних систем Hgt1p/Opt1p згодом знову повертається у внутрішньоклітинне середовище. [165]. Водночас, активний витік GSH виникає у відповідь на проапоптотичні подразники [166]. Показано, що надекспресія високоспорідненого транспортера глутатіону Hgt1p/Opt1p у *S. cerevisiae* сприяла підвищенню вмісту внутрішньоклітинного

GSH та подальшому зростанню чутливості до екзогенного глутатіону. Водночас інактивація транспортера Opt1p сприяє трикратному підвищенню концентрації глутатіону у позаклітинному середовищі внаслідок послаблення зворотнього інгібування першого гена біосинтезу глутатіону кінцевим продуктом [167, 168].

### **1.7. Фактори захисту клітин в стресових умовах алкогольної ферментації**

В умовах алкогольної ферментації етанол є вагомим стресовим чинником для клітин мікроорганізмів. З фізіологічної точки зору етанол інгібує ріст та життєздатність клітин внаслідок зміни проникності цитоплазматичної мембрани, що супроводжується зростанням надходження  $H^+$  в клітину, в результаті відбувається зниження внутрішньоклітинного рН та зміна електрохімічного потенціалу мембрани, що має негативний вплив на швидкість транспорту цукрів [169].

Трегалоза та білки теплового шоку, які синтезуються за умов етанольного стресу, відіграють важливу роль в стабілізації мембран та білків клітини, запобігаючи утворенню білкових агрегатів. Зміна ліпідного складу цитоплазматичної мембрани дозволяє зберегти цілісність клітин під дією високої концентрації етилового спирту [170]. Встановлено, що експресія Hsp104, Hsp70 та Hsp26 зростає із збільшенням концентрації етанолу з 4% до 10%, в той час як максимальна експресія Hsp82 та Hsp30 спостерігається при 6% етанолу. Інактивація Hsp104 призводила до зниження толерантності до етанолу та термотолерантності [169]. Серед генів, які репресуються в умовах короткочасної дії етанолу (7%), виявлено ті, які залучені у процес біосинтезу РНК, білка та клітинний цикл. Гени, експресія яких зростає під дією етанолу, здебільшого залучені в енергетичний обмін та стресову відповідь, також зростає експресія значної кількості генів залучених у гліколіз, що забезпечує синтез попередника трегалози глюкозо-6-фосфату [170].

Утворення активних сполук кисню (ROS) зростає за умов теплового шоку, підвищеної концентрації кисню та етанолу, і як наслідок обумовлює виникнення оксидативного стресу. Каталаза та супероксиддисмутаза є основними ферментами антиоксидантної системи захисту клітин в умовах оксидативного стресу. Трипептид глутатіон ( $\gamma$ -глутамілцистеїнілгліцин, GSH) як представник неферментативної системи захисту від оксидативного стресу, може спонтанно відновлювати активні форми кисню (наприклад,  $H_2O_2$ ) або реагувати з електрофільними сполуками. GSH також виконує функцію антистресового захисту у складі ферментативних систем (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіонтрансфераза,  $\gamma$ -глутамілтрансфераза) або шляхом глутатіонування окиснених (білок-SOH, або сульфенатний білок) або нітрозильованих (білок-SNO) білків, захищаючи їх від незворотної втрати активності при зміні редокс статусу клітини [171].

Попередня обробка лігноцелюлози кислотою призводить до утворення численних побічних продуктів, таких як альдегіди фурану, слабкі кислоти та похідні фенолу, які пригнічують ріст мікроорганізмів та продукцію етанолу. Транскрипційний фактор Yap1 був визначений як один із ключових регуляторів, що бере участь в адаптації до фурфуролу та 5-гідроксиметилфурфуролу (HMF) у *S. cerevisiae* і знижує клітинний рівень глутатіону [172]. Це дозволило припустити, що фурфурол та HMF можуть викликати оксидативний стрес. [173]. Надмірна експресія *YAP1* може надавати стійкість до фурфуролу та HMF шляхом активації генів антиоксидантних ферментів [172]. Мішенню Yap1 також є *ADH7* та *GRE2*, які беруть участь у відновленні альдегідів фурану [173], а також *FLR1*, *YCF1* та *SNQ2* – гени транспортерів, що можуть бути причетні до виведення та детоксикації фурфуролу і HMF. Крім того, показано, що фурфурол індукує накопичення активних радикалів кисню (ROS), а це призводить до пошкодження клітин дріжджів, зокрема мітохондріальних та вакуолярних мембран [174]. Інгібування біосинтетичних шляхів внаслідок виснаження NADPH під час відновлення фурфуролу та HMF також може бути причиною їх токсичності. У



*E. coli* показано, що NADPH-залежний шлях асиміляції сірки гальмується в клітинах, які оброблені фурфуралом, а додавання амінокислот, що містять сірку, цистеїн та метіонін, підвищує резистентність до фурфуролу [175].

Також доведено роль GSH в забезпеченні резистентності клітин дріжджів *S. cerevisiae* до високої концентрації ацетальдегіду, який є проміжним продуктом алкогольної ферментації. За наявності ацетальдегіду спостерігалось зниження вмісту внутрішньоклітинного GSH внаслідок безпосереднього зв'язування та подальшої детоксифікації ацетальдегіду у складі утворених комплексів. Також було встановлено, що наслідком порушення процесу біосинтезу GSH є пригнічення життєздатності клітин за наявності ацетальдегіду [176].

## **1.8. Підсумок**

Цей розділ містить огляд основних напрямків та досягнень в галузі молекулярної інженерії та селекції поліпшених продуцентів етанолу з ксилози. Значну увагу зосереджено на перших етапах метаболізму ксилози та його регуляції, оскільки мікроорганізми, що зброджують гідролізати лігноцелюлози, повинні характеризуватись високою продуктивністю, стійкістю до утвореного етанолу, максимальною термотолерантністю та здатністю одночасної утилізації кількох вуглецевих субстратів. Крім цього, описано важливість глутатіону як фактора захисту клітин в стресових умовах алкогольної ферментації та основні підходи отримання надпродуцентів цього трипептиду у дріжджів.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали досліджень

У роботі було використано хімічні сполуки, реактиви та ферменти виробництва фірм «Sigma» (США), «NEB» (США), «Promega» (США), «Roth» (Німеччина), «Difco» (США), «Reanal» (Угорщина), «Fermentas» (Литва). Хімічні реактиви вітчизняного виробництва мали кваліфікації «хч» та «осч».

#### 2.2. Штами мікроорганізмів

Штами дріжджів *O. polymorpha* та бактерій *E. coli*, що використовувались у даній роботі представлені у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

#### Штами мікроорганізмів використаних у роботі

Назва штаму	Генотип/Примітки	Посилання
<i>O. polymorpha</i>		
NCYC495	<i>leu1-1</i>	[177]
2EthOH <sup>-</sup> /XYL1m/XYL2/XYL3/Br PA/Δcat8	<i>cat8::hphNT1</i> , pX1M-Z-X2 ( <i>GAPp-XYL1mod-AOXt</i> , <i>GAPp-XYL2-XYL2t</i> ), pGLG61/XYL3 ( <i>GAPp-XYL3-AOXt</i> ), резистентний до бромпірувату	[5, 110]
2EthOH <sup>-</sup> /XYL1m/XYL2/XYL3 /BrPA/DAS1/TAL2	pX1M-Z-X2 ( <i>GAPp-XYL1mod-AOXt</i> , <i>GAPp-XYL2-XYL2t</i> ), pGLG61/XYL3 ( <i>GAPp-XYL3-AOXt</i> ), резистентний до бромпірувату, pUC57/DAS1/TAL2/NTC ( <i>GAPp-DAS1-DAS1t</i> , <i>GAPp-TAL2-TAL2t</i> )	Пункт 3.2.1

<i>hxt1Δ</i>	<i>hxt1Δ::ScLEU2 leu1-1</i>	[10]
<i>hxt1Δ/HXT1_N</i>	pUC19_zeo_HXT1 ( <i>GAPp- HpHXT1-HXT1t</i> )	Пункт 3.1.1
<i>hxt1Δ/HXT1_M</i>	pUC19_zeo_GAP_HXT1_N358A ( <i>GAPp- HpHXT1_N358A-HXT1t</i> )	Пункт 3.2.1
<i>hxt1Δ/HXT1_K</i>	pUC19_zeo_GAP_HXT1_K ( <i>GAPp- HXT1_Hp_K8,9,30R-HXT1t</i> )	Пункт 3.3.1
<i>hxt1Δ/HXT1_KM</i>	pUC19_zeo_GAP_HXT1_N358A_K ( <i>GAPp-HpHXT1_N358A_K8,9,30R-HXT1t</i> )	Пункт 3.3.1.
BEP/ <i>cat8Δ/HXT7</i>	pUC19/prGAP_HXT7/NTC ( <i>GAPp- ScHXT7_N370S-GAPt</i> )	Пункт 3.1.5
BEP/ <i>cat8Δ/GAL2</i>	pUC19/prGAP_GAL2/NTC ( <i>GAPp- ScHXT7_N376F-GAPt</i> )	Пункт 3.1.5
BEP/ <i>cat8Δ/HXT1</i>	pUC19_prGAP_NTC_HXT1_N358A_K ( <i>GAPp- HpHXT1_N358A_K8,9,30R -GAPt</i> )	Пункт 3.1.5
DL-1	<i>leu2</i>	[141]
mcGSH2	<i>leu2 :: LEU2 :: mcGSH2</i> (pGLG61- <i>HpGSH2</i> )	[15]
mcGSH2/MET4	pUC19/prGAP_MET4/NTC ( <i>GAPp- HpMET4-GAPt</i> )	Пункт 3.3.1
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5α	<i>lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169</i>	[178]

### 2.3. Плазмід

Плазмід, що використовувались у даній роботі для створення надпродуцентів етанолу із ксилози та глутатіону представлено у таблиці 2.2.

## Перелік векторів, використаних у дисертаційній роботі

Назва	Посилання на конструювання
pUC19_zeo_HXT1	Пункт 3.1.1
pUC19_zeo_GAP_HXT1_N358A_Hp	Пункт 3.1.1
pUC19_zeo_GAP_HXT1_K_Hp	Пункт 3.1.1
pUC19_zeo_GAP_HXT1_N358A_K_Hp	Пункт 3.1.1
pUC19/prGAP_HXT7/NTC	Пункт 3.1.5
pUC19/prGAP_GAL2/NTC	Пункт 3.1.5
pUC19_prGAP_NTC_HXT1_N358A_K_Hp	Пункт 3.1.5
pUC19/prGAP_MET4/NTC	Пункт 3.3.1
pRS41N	[179]
pGLG61/DAS1	[12]
pGLG61/TAL2	[12]
pUC57/DAS1/TAL2/NTC	Підпункт 3.2.1

## 2.4 Праймери

Праймери, що використовувались у даній роботі з метою створення та перевірки коректності сконструйованих векторів для створення надпродуцентів етанолу із ксилози та глутатіону представлено у таблиці 2.3.

## Перелік праймерів, використаних для проведення досліджень

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність праймера 5' → 3'
Ко277	CCGGAATTC GGATCCGGTATTTATAGCCCAATTATC
Ко280	CGCGGATCC GATGCATTCTATTTGGTATC
Ко405	CGCGGATCCACTCATGATCCCTGCGTCTAG
Ко413	AAACTGCAGTCATTATCCACCCAGAGGCTC

Ko644	CGC GGA TCC TAG ACC ACA TCC GTG CAC CAG
Ko645	GTA AAT ATG TAG ATG GAG CCG AGC CTC GAG CCC GGG GCG GCC GCT CTA GAT TTG TTT CTA TAT TAT CTT TGT ACT AAA G
Ko646	CTT TAG TAC AAA GAT AAT ATA GAA ACA AAT CTA GAG CGG CCG CCC CGG GCT CGA GGC TCG GCT CCA TCT ACA TAT TTA C
Ko647	CGC GTC GAC CTG CCA CGA GGT ACC ACA AAG
Ko655	TAG TCT AGA ATG TGT GGC GCA GTA TGG C
Ko656	AAA GCG GCC GCC TAG TTT GGC TTC GGG AAA C
OK42	CGC CAT ATG ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA T CT TAA CTA TGC GGC ATC AGA G
OK43	CGC CAT ATG ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TCC GAG ATT CAT CAA CTC ATT GC
OK159	TGC TCTAGA TAG ACC ACA TCC GTG CAC CAG
OK160	GTT GAT CCG CGT TAG ACA TGC GGC CGC TTT GTT TCT ATA TTA TCT TTG TAC TAA A
OK161	TTT AGT ACA AAG ATA ATA TAG AAA CAA AGC GGC CGC ATG TCT AAC GCG GAT CAA C
OK162	CAT GCATGC TTA AAA GTG GTC CGA GGA G
OK163	TTT GCGGCCGC ATG TCT AAC GCG GAT CAA CAA TCC AAA AAA TC
OK164	GA GGC AAA <b>GGC</b> GAC AAC ACC AAG AAC
OK165	GTT CTT GGT GTT GTC <b>GCC</b> TTT GCC TC
OK166	CAA CAA TCC <b>AGA AGA</b> TCT GAT ATT GGC TCT GTC ACG CCT CCT CCG GAG AAC GTG TAC GAG GAC CAA GCA CAC AAC <b>AGG</b> GCA AC
OK167	GT TGC <b>CCT</b> GTT GTG TGC TTG GTC CTC GTA CAC GTT CTC CGG AGG AGG CGT GAC AGA GCC AAT ATC AGA <b>TCT TCT</b> GGA TTG TTG
OK203	TGC TCT AGA ATG TCA CAA GAC GCT GCT ATT G)
OK204	TGC TCT AGA ATG TCA CAA GAC GCT GCT ATT G
OK205	GTC TTG GGT ATT GTT AGC TTT GCT TCC
OK207	TGC TCT AGA ATG GCA GTT GAG GAG AAC
OK208	GT GGA GGC AAA GAA GAC TAC ACC
OK209	GGT GTA GTC TTC TTT GCC TCC AC
OK216	TTT GCGGCCGC TTA GAC CTT TTC AGT GGA GTC GTG
OK217	TGC TCT AGA TTA TTT GGT GCT GAA CAT TC
OK218	TGC TCT AGA TTA TTC TAG CAT GGC CTT G

## 2.5. Поживні середовища

Дріжджові штами *O. polymorpha* культивували при 37 та 45°C на багатому середовищі (YPD: 1% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 2% глюкоза [179]) та на

стандартному мінеральному середовищі (YNB: 0,67% Yeast Nitrogen Base, 2% глюкоза). Для вирощування ауксотрофних штамів на мінеральних середовищах додавали відповідні фактор росту – лейцин, в концентрації 40-50 мг/л. Селекцію трансформантів *O. polymorpha* проводили на середовищі з зеоцином (200 мг/л), генетицином (0,3-1 г/л) та норзеотрицином (100 мг/л). Середовища стерилізували автоклавуванням; водні розчини лабільних сполук фільтрували через нітроцелюлозні фільтри (розмір пор 0,2 мкм) і додавали до середовищ перед використанням. Агаризовані середовища і для бактерійних, і для дріжджових штамів містили 2% агару.

Бактерії *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  вирощували при 37 °C на багатому (LB) середовищі, [179]. Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

## **2.6. Біохімічні методи**

### **2.6.1. Отримання безклітинних екстрактів**

Для приготування безклітинних екстрактів використовували скляні кульки. На першому етапі до осаду відмитих від культуральної рідини клітин додавали 50 мМ Тріс-НСІ буфер, рН 7,5 з 1 мМ PMSF (фенілметансульфонілфлуорид) до кінцевої концентрації клітин 50-100 мг/мл. Одержану суспензію переносили у пластикові пробірки «Еппендорф» та додавали скляні кульки (діаметр 0,45-0,5 мм) в кількості 3/4 від об'єму суспензії і заморожували. Клітини руйнували методом вортексування (вібрації) протягом 15 хв. при +4 °C з охолодженням на льоді через кожні 5 хв. Для отримання безклітинного екстракту гомогенізатор центрифугували протягом 20 хв при 14000 об./хв. при +4 °C на мікроцентрифузі. Супернатант використовували для подальшого аналізу.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі та співавторами [180], використовуючи бичачий сироватковий альбумін відомої концентрації - 10-800 мкг/мл як стандарт

### **2.6.2. Визначення активності ферментів**

Для визначення активності DAS використовували реакційну суміш, що містила калій фосфатний буфер, рН 7,0 - 250 мМ, MgCl<sub>2</sub> - 5 мМ, тіамін пірофосфат - 0,25 мМ, формальдегід - 1,25 мМ, ксилулозо-5-фосфат - 0,5 мМ. Реакцію запускали додаванням 100 мкл безклітинного екстракту (0,2 мг білка) до 2 мл реакційної суміші. Суміш інкубували 3-10 хв при 30 °С, протягом інкубації відбирали по 0,2 мл зразків з інтервалом 1-2 хв і додавали до пробірок по 0,5 мл 0,1% розчину 2,4-динітрофенілгідразину в 2н НСl. Пробірки закривали і кип'ятили на водяній бані протягом 30 хв, швидко охолоджували і додавали по 10 мл розчину 20% КОН в суміші вода:етанол (4:7). Оптичну густина вимірювали при 560 нм та 435 нм за допомогою спектрофотометра. Активність фермента визначали за різницею OD<sub>560</sub>-OD<sub>435</sub>. Обрахунок активності здійснювали за калібрувальною кривою, побудованою за розчином дигідроксиацетону відомої концентрації - 0,01-0,1М [181].

Для визначення активності TAL готували реакційну суміш: Tris-HCl буфер, рН 7,5 - 67 мМ, D-еритрозо-4-фосфат - 2 мМ, D-фруктозо-6-фосфат - 6,7 мМ, NAD - 0,2 мМ, гліцерофосфатдегідрогеназа - 2 МО, тріозофосфатізомераза - 2 МО. Для запуску реакції до суміші додавали безклітинний екстракт у концентрації 0,1 мг білка і визначали зміну екстинції при довжині хвилі 340 нм в кінетиці [182].

### **2.6.3. Визначення вмісту GSH в клітинах**

Принцип методу полягає в реєстрації відновленого забарвленого продукту, який утворюється в результаті функціонування циклу регенерації GSH з комплексом 5,5'-дітіобіс (2- нітробензойна кислота) (DTNB)– GSH за участю глутатіонредуктази та NADPH. Оскільки калориметрична реакція є стійкою і збільшення оптичної густини відбувається лінійно протягом 30 хв, концентрація

GSH може бути визначена кінетичним методом чи pseudo-end point методом (без зупинки реакції; швидкий вимір оптичної густини в межах 10-30 хв) [168].

Перед визначенням готують суміш реагентів на льоді.

Суміш реагентів:	1 проба × 1мл	10 проб× 1мл	40 проб× 1мл
NADPH 2,5 мМ	0,7 мл	7 мл	28 мл
Глутатіонредуктаза (розчин, 5 мкл 1000 мкл буферу)	0,0125 мл	0,125 мл	0,5 мл
0,05 М калій-фосфатний буфер, рН 7,5; 5 мМ ЕДТА 3,5 мл (Ethylenediaminetetraacetic acid)	0,0875 мл	0,875 мл	3,5 мл

800 мкл суміші реагентів вносили у пробірки для калібрування та проб. Додавали в кожен з пробірок для калібрування по 100 мкл розчину GSH (0; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 мкМ) та по 100 мкл для проб певного розведення. Вносили в кожен пробірку по 100 мкл 3 мМ розчину DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)), перемішували, залишали при кімнатній температурі протягом 20хв. Оптичну густину визначали при 420 нм в кінетичному режимі (OD старт., OD кінц.,  $\Delta OD/xv$ ).

## 2.7. Основні молекулярно-генетичні методи

### 2.7.1. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів

Даний метод є модифікацією методу, розробленого для *S. cerevisiae* [183] з використанням літикази для сферопластування клітин, рибонуклеази А для розщеплення РНК та осадження ДНК спиртом. Цей метод використовується для виділення (через ретрансформацію *E. coli*) плазмідної ДНК з клітин дріжджових



трансформантів. Метод було оптимізовано при виконанні даної роботи.

Клітини вирощували в 3 мл рідкого селективного середовища при 37 °С до пізньої логарифмічної фази (OD 4-6; довжина хвилі 600 нм, кювета 1 см). Біомасу осаджували центрифугуванням і ресуспендували в 0,3 мл 50 мМ ЕДТА буферу (рН 8,0). До ресуспендованих клітин додавали літиказу (50 МО) та інкубували 60 хв при 37 °С. Клітини осаджували центрифугуванням при 12000 об/хв протягом 2 хв, супернатант зливали, а до осаду додавали 0,3 мл лізуючого розчину (0,2 % SDS, 50 мМ ЕДТА). Після ресуспендування осаду мікропробірки прогрівали при 65°С протягом 15-30 хв. Мікропробірки охолоджували до кімнатної температури, до інкубаційної суміші додавали 0,1 мл 3М ацетату калію рН 5,2; енергійно перемішували та витримували на льоді 5 хв, потім центрифугували при 12000 об/хв протягом 3 хв. Супернатант переносили до чистих мікропробірок, що містили по 0,3 мл ізопропанолу. Проби витримували протягом 10 хв, після чого центрифугували при 12000 об/хв протягом 3 хв, супернатант зливали, а осад промивали 70% етанолом та підсушували. Одержану ДНК розчиняли в 100 мкл ТЕ буферу, додавали 5 мкл РНКазу А (10 мг/мл), перемішували та інкубували 20 хв при 37 °С. До інкубаційної суміші додавали 100 мкл фенолу, насиченого буфером. Центрифугували при 14000 об/хв 15 хв, водну фазу переносили у свіжу центрифужну мікропробірку, додавали 0,1 об'єму 3М ацетату калію рН 5,2 та 2 об'єми 96% етанолу. Витримували при -20 °С 15 хв, центрифугували при 14000 об/хв 15 хв, одержаний осад промивали 70% етанолом та підсушували. Одержану нуклеїнову кислоту розчиняли в 30 мкл ТЕ-буферу, зберігали при -20 °С.

### **2.7.2. Виділення плазмідної ДНК з клітин *E. coli***

Клітини трансформантів *E. coli* вирощувались у середовищі LB з ампіциліном або еритроміцином в концентрації 100 мг/л (об'єм 1,5 мл) протягом

14-16 год. та осаджувались центрифугуванням (10 тис. об./хв, 3 хв) у пластикових пробірках двічі для повного видалення залишків поживного середовища. Осад клітин ресуспендували в 0,15 мл ТЕ-буферу (рН 7,5) перемішуванням та додавали 0,15 мл 0,2 М розчину NaOH і 1% SDS, інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хв. Після цього додавали 0,15 мл 2М ацетату калію; акуратно перемішували та інкубували на льоді протягом 15 хв. Осад білків осаджували центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 20 хв (при кімнатній температурі) та відбирали супернатант (0,4 мл) у чисті пробірки. До супернатанту додавали 0,7 об'єму (0,3 мл) ізопропанолу, перемішували та центрифугували при 10 тис. об./хв протягом 20 хв при кімнатній температурі. Осад ДНК та РНК промивали 70% етанолом та після підсушування ресуспендували у 40 мкл стерильної дистильованої води або ТЕ буферу. Розчин ДНК зберігати при -20 °С.

Для виділення плазмідної ДНК у препаративних кількостях використовували набір реагентів (midi-kit) фірми «Qiagen» (США) згідно методики виробника.

### **2.7.3. Конструювання векторів**

Метод розщеплення ДНК рестриктазами базується на здатності ендонуклеаз рестрикції класу II розщеплювати ДНК в певних специфічних сайтах. В даній роботі користувалися методикою описаною раніше [185], та інструкціями виробників ферментів: «Fermentas» (Литва), «NEB» (США), «Promega» (США).

Для затуплення “липких” (комплементарних) кінців лінеаризованої ДНК векторів (з метою наступного лігування фрагментів ДНК з “тупими” кінцями) використовували великий фрагмент ДНК-полімерази I *E. coli* (фрагмент Кленова). В даному методі використовують 5'-3' полімеразну активність

фрагмента Кленова. При цьому відбувається добудова вкорочених 3'-кінців, утворених в результаті розщеплення ДНК ферментами рестрикції [185].

Для дефосфорилювання липких кінців ДНК лінеаризованого вектора, з метою запобігання самолігування, використовували лужну фосфатазу СІР виробництва "NEB" (США), та рекомендовані виробником умови реакції.

Лігування лінеаризованих фрагментів ДНК здійснювали за методикою, описаною раніше деякими змінами. При лігуванні використовували ДНК-лігазу бактеріофага Т4. Реакцію проводили в буфері, що був у комплекті з фірмовим препаратом лігази («Promega» (США)) згідно з інструкціями виробника. Для виділення рекомбінантних плазмід лігазну суміш після очистки осадженням етанолом, або очистки на колонці фірми «Quiagen» (США) (Quiagen PCR purification Kit) трансформували у клітини *E. coli* методом електропорації.

#### **2.7.4. Трансформація дріжджів *O. polymorpha***

Трансформацію *O. polymorpha* проводили методом електропорації як описано раніше [184]. Метод базується на здатності дріжджових клітин під впливом електричного імпульсу поглинати екзогенну ДНК. Після трансформації дріжджів *O. polymorpha*, перед висівом на чашки з антибіотиком, клітинну суміш інкубували протягом години при 37 °С в 1 мл середовища YPD. Трансформацію бактерій *E. coli* проводили медом електропорації [185].

#### **2.7.5. Базові молекулярно-генетичні методи**

Виділення та очистку плазмідної ДНК, підготовку та трансформацію компетентних клітин *E. coli*, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюцію фрагментів ДНК з агарозного гелю, розщеплення ДНК рестриктазами, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК, ампліфікацію фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) здійснювали як описано у [185]. Очистку

ДНК проводили на колонках фірми «Quiagen» (США) (Quiagen PCR purification Kit). При ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР використовували синтетичні олігонуклеотидні праймери фірм «IDT Technologies» або «Sigma» (США).

#### **2.7.6. ПЛР у реальному часі**

Сумарну РНК з клітин дріжджів виділяли з використанням набору GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit with DNase I (EURx Ltd., Польща). Усі маніпуляції з РНК проводили при охолодженні. Клітини дріжджів осаджували при 4000 об./хв протягом 5 хв, ресуспендували в 1 мл Трізолу. До отриманої суспензії додавали 0,2 мл скляних кульок (діаметр 0,45 мм) і руйнували шляхом струшування на вортексі «FastPrep» при 6000 об./сек протягом 20 сек. Гомогенну суміш центрифугували при 14000 об./хв протягом 15 хв. Супернатант переносили у чисті пробірки типу «Еппендорф», додавали 0,2 мл хлороформу, інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв та центрифугували при 14000 об./хв протягом 15 хв. З відібраної водної фази шляхом преципітації 0,5 мл ізопропанолу отримували нерозчинну фракцію сумарної РНК, яку осаджували при 14000 об./хв протягом 15 хв. Осад промивали 70% охолодженим етанолом, підсушували і розчиняли у DEPC-обробленій воді. Отримані проби слугували матрицями для синтезу одноланцюгової кДНК. Концентрацію РНК визначали за допомогою Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer та розчиняли у воді, позбавленій РНКазної активності. ПЛР у реальному часі проводили на приладі Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System з використанням набору SG OneStep qRT-PCR kit (EURx Ltd., Польща), РНК як матриці та ROX як барвника для нормалізації інтенсивності свічення інтеркалюючих барвників типу Syber Green згідно інструкцій виробника. 100 нг РНК було використано в 20 мкл реакційної суміші, що містить

0,4 мкМ відповідних праймерів (таблиця 2.3). Використовували наступні параметри ампліфікації: 30 хв при 50 °С для синтезу кДНК; 3 хв при 95 °С підготовка, 40 циклів 15 с при 94 °С та 30 с при 60 °С. Кратну зміну амплікона в дослідному зразку у порівнянні з контрольним зразком вимірювали в трьох повторях.

## **2.8. Умови алкогольної ферментації дріжджів**

Для проведення алкогольної ферментації глюкози та ксилози дріжджову біомасу *O. polymorpha* нарощували на повному середовищі YPD/YPX (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 2% глюкоза/ксилоза) упродовж двох діб на орбітальному шейкері (220 об./хв) при температурі 45 °С. Клітини осаджували центрифугуванням та промивали водою. Біомасу (2 мг/мл клітин) переносили в мінеральне середовище YNB з додаванням 10% ксилози або суміші глюкоза/ксилоза у співвідношеннях 5% : 5%, 3% : 7% та 7% : 3%. Алкогольну ферментацію проводили на орбітальному шейкері при температурі 45 °С за умов обмеженої аерації (140 об./хв) упродовж 5 діб. Експерименти проводили щонайменше у трьох повторях.

Біомасу дріжджів визначали нефелометрично на спектрофотометрі Helios  $\gamma$  ( $\lambda = 600$  нм, кювета 1 см), розраховуючи суху вагу за калібрувальною кривою.

## **2.9. Програмне забезпечення для пошуку та аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей**

У роботі використовувалися бази даних *O. polymorpha* - <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html> та *S. cerevisiae* - <http://www.yeastgenome.org/>. Аналіз нуклеотидної послідовності ДНК проводили за допомогою програм: NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>); Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) та пакету

програм доступних на <http://www.bioinformatics.org/sms/>. Для порівняльного аналізу амінокислотних та нуклеотидних послідовностей використовували програми доступні на <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Для аналізу амінокислотних послідовностей використовували алгоритм Multalin версії 5.4.1, (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) і Boxshade 3.21 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). Пошук подібності амінокислотних послідовностей проводили, використовуючи мережевий сервіс BLAST Національного центру біотехнологічної інформації (Bethesda, MD, USA), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

## **2.10. Визначення концентрації аналітів**

Концентрації етанолу, ксилози, глюкози та ксиліту в середовищі визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (PerkinElmer, Series 2000, USA), використовуючи іонообмінну колонку Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA). Як рухомих фаз використовували 4 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при швидкості потоку 0,6 мл/хв та температурі колонки 35 °С. Концентрацію етанолу в середовищі також визначали за допомогою набору «Алкотест», за принципом: етанол при дії алкогольоксидази окислюється киснем повітря до ацетальдегіду та перекису водню. Останній у спряженій пероксидазній реакції окислює хромоген до кольорового продукту, який визначається фотометрично [186].

## **2.11. Статистичний аналіз експериментальних даних**

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи стандартні методи. Усі досліди повторювали тричі з трьома паралельними експериментами у кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках та точка ординати діаграм відповідає середньому значенню "М", розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з декількох однотипних

експериментів. Середню похибку "m" отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки "σ". На рисунках вона представлена біля кожної точки вертикальною лінією, довжина якої відповідає величині "m". Порівняння двох мінливих величин здійснювали на підставі показника вірогідності різниці "t" (критерій Ст'юдента). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли імовірність різниці "p" була меншою 0,05 [187]. Результати дослідів представляли як середнє значення ± стандартне відхилення.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1. Конструювання рекомбінантних штамів *O. polymorpha* здатних до одночасного споживання глюкози та ксилози за умов високотемпературної алкогольної ферментації**

Ефективна ферментація цукрів, що входять до складу геміцелюлози, дозволила би зменшити собівартість процесу виробництва етанолу з лігноцелюлози на 25% [47]. Цей факт стимулює пошук природних та створення рекомбінантних штамів мікроорганізмів, здатних одночасно зброджувати усі гексози та пентози у складі целюлозної та геміцелюлозної фракцій.

Першим етапом метаболізму ксилози є її транспорт у клітину. У дріжджів *Candida intermedia*, здатних утилізувати ксилозу як джерело Карбону, були виявлені транспортери як з високою, так і з низькою спорідненістю до ксилози, активність яких залежить від концентрації цукру в середовищі. При високій концентрації ксилози транспорт відбувається шляхом полегшеної дифузії за допомогою низько споріднених систем транспорту за градієнтом концентрації. При низькій концентрації цукру активуються високо споріднені транспортні системи (ксилозо-протонна симпортна система) [188]. Високо споріднені системи транспорту є специфічними для ксилози, а низько споріднені забезпечують транспорт у клітину як ксилози, так і глюкози.

Незважаючи на те, що дріжджі *S. cerevisiae* не здатні метаболізувати ксилозу, її транспорт у клітину забезпечують гексозні транспортери родини Нхт, які мають в 100 разів меншу спорідненість до ксилози порівняно з глюкозою. Це призводить до того, що в глюкозо-ксилозних сумішах спочатку утилізується



глюкоза, а потім ксилоза [6]. Почергове споживання обох цукрів обумовлює збільшення тривалості процесу ферментації та знижує її результативність.

Одним з можливих шляхів отримання дріжджових штамів з покращеними параметрами алкогольної ферментації є білкова інженерія гексозних транспортерів для збільшення афінності до ксилози і зменшення до глюкози. Основним недоліком усіх ендогенних транспортерів Hxt є їх низька спорідненість до ксилози порівняно з глюкозою, внаслідок чого глюкоза поглинається та метаболізується першою під час ко-ферментації цукрів, гальмуючи утилізацію ксилози, що небажано для промислового виробництва біоетанолу, під час якого важливе одночасне споживання цукрів, наявних у середовищі [66, 73, 74]. Перевагою ендогенних транспортерів є те, що вони добре експресуються та підлягають системі регуляції, яка контролює експресію й посттрансляційну деградацію в умовах високої та низької позаклітинної концентрації глюкози. Хоча ендогенні гексозні транспортери (родина Hxt) можуть бути модифіковані для підвищення спорідненості до пентоз, вони підлягають глюкозорегульованій деградації білка [65, 72]. Крім цього, нещодавно було показано, що деградація транспортерів глюкози з низькою афінністю є надто швидкою, щоб забезпечити депонування ксилози, незважаючи на те, що ці транспортери підтримують транспорт ксилози з високою швидкістю поглинання [9].

Таким чином, зокрема у дріжджів *S. cerevisiae* за відсутності глюкози або після виснаження глюкози в середовищі, деякі Hxt білки (зокрема, Hxt1 та Hxt3) видаляються із цитоплазматичної мембрани [9]. Ця проблема може бути вирішена за допомогою мутагенезу ендогенних Hxt транспортерів, завдяки чому транспорт ксилози буде відбуватися навіть у присутності глюкози. Отже, наслідком пригнічення швидкості деградації Hxt білків може бути покращення транспорту ксилози.

У геномі цих дріжджів був виявлений функціональний гексозний транспортер Hxt1, що виявляє найвищий ступінь гомології до транспортерів гексоз *S. cerevisiae* Hxt3 (59% ідентичності, 75% подібності), Hxt6 та Hxt7 (58% ідентичності, 73% подібності), Hxt1 (57% ідентичності, 74% подібності) (Рис. 3.1) [10].

OpHxt1	1	MSN-A---DQQS---K---KSDIGSVTPPPENVYEDQAHNKATL--PEHQ--DISTGK
ScHxt6	1	MSQDA-ATAEQT-PVEHLSAVDSASHSVLSTPSNKAE-RDEIKAYGEGEHEFPVVEIPKR
ScHxt7	1	MSQDA-ATAEQT-PVEHLSAVDSASHSVLSTPSNKAE-RDEIKAYGEGEHEFPVVEIPKR
ScHxt1	1	MNSTPDLISFCKSNSSNSNYELESGRSKAMNTPGKNE-SFHD--NLSESQVQPAVAPPNT
ScHxt3	1	MNSTPDLISFCKSSSENSNADLPSNSSQVMNMPBEKGV-QD----DF-QAEADQVLTNPNT
OpHxt1	45	SAMQYLGTLICSLIAFGGFVFGWDTGTISGFVNMDFEKNRFGQINGEGERYLSNVRTGL
ScHxt6	58	PASAYVTVSIMCIMIAFGGFVFGWDTGTISGFINQTDFTRRFGMKHKDGTNYLSKVRTGL
ScHxt7	58	PASAYVTVSIMCIMIAFGGFVFGWDTGTISGFINQTDFTRRFGMKHKDGTNYLSKVRTGL
ScHxt1	58	GKGVYVTVSICCVMMVAFGGFIFGWDGTISGFVAQTDFTRRFGMKKHHDGSHYLSKVRTGL
ScHxt3	55	GKGAAYVTVSICCVMMVAFGGFVFGWDTGTISGFVAQTDFTRRFGMKHKDGSYYLSKVRTGL
OpHxt1	105	MSIFNIGCALGGITLGRRLADSKGRKVGIMTMTIVYIVGIVIQIASITSWVQFFIGRIIS
ScHxt6	118	IVSIFNIGCAIGGIILSKLGDYGRKVGIVVVVYIYIGI IQIASINKWYQYFIGRIIS
ScHxt7	118	IVSIFNIGCAIGGIILSKLGDYGRKVGIVVVVYIYIGI IQIASINKWYQYFIGRIIS
ScHxt1	118	IVSIFNIGCAIGGIIVLAKLGDYGRRIIGLIVVVVYIYIGI IQIASINKWYQYFIGRIIS
ScHxt3	115	IVSIFNIGCAIGGIILAKLGDYGRKMGIVVVVYIYIGI IQIASINKWYQYFIGRIIS
OpHxt1	165	GLAVGSVSVLCPMFISETSPKEIRGALVSSYQLMITLGI FLGYCTTYGTYHNYDDSRQWR
ScHxt6	178	GLGVGGIAVLSPLMISEVSPKHLRGTLVSCYQLMITAGIFLGYCTNFGT-KNYSNSVQWR
ScHxt7	178	GLGVGGIAVLSPLMISEVSPKHLRGTLVSCYQLMITAGIFLGYCTNFGT-KNYSNSVQWR
ScHxt1	178	GLGVGGITVLSPLMISEVAPSEMRTLVSCYQVMITLGI FLGYCTNFGT-KNYSNSVQWR
ScHxt3	175	GLGVGGIAVLSPLMISEVAPKEMRTLVSCYQLMITLGI FLGYCTNFGT-KNYSNSVQWR
OpHxt1	225	VPLGLCFAWALVMTFGMTFMPESPRYLVEKDRLEDAKRSIKVNKVEIDSEFVVEHEAAITL
ScHxt6	237	VPLGLCFAWALFMIGGMTFVPESPRYLAEVGIIEAKRSIAVSNKVAVDDEPSVLAEEVAV
ScHxt7	237	VPLGLCFAWALFMIGGMTFVPESPRYLAEVGIIEAKRSIAVSNKVAVDDEPSVLAEEVAV
ScHxt1	237	VPLGLCFAWALFMIGGMTFVPESPRYLVEAGRI DEARASIAKVNKCFPDHPYIQYELETTI
ScHxt3	234	VPLGLCFAWALFMIGGMTFVPESPRYLVEAGQI DEARASISKVNKVAPDHPFIQOELEVI
OpHxt1	285	LNSIEIERQAGSASWGEFLTGKPKIFYRLEFVGVIIQSLQQLSGDNYFFYYGTTIFKSVGL
ScHxt6	297	LAGVEAEKLAGNASWGEFLTSSKTKVLRQLIMGAMIQSLQQLTGDNYFFYYGTTIFKAVGL
ScHxt7	297	LAGVEAEKLAGNASWGEFLTSSKTKVLRQLIMGAMIQSLQQLTGDNYFFYYGTTIFKAVGL
ScHxt1	297	EASVEEMRAAGTASWGEFLTGKPFAMFORITMMGIMIQSLQQLTGDNYFFYYGTTIVFQAVGL
ScHxt3	294	EASVEEARAAGSASWGEFLTGKPFAMFKRITMMGIMIQSLQQLTGDNYFFYYGTTIVFNAVGM
OpHxt1	345	TDSFETSIVLGVVNFFASTIGSLFVVDVFRGRRTLLGGCIGMAVCLVIFAAIGTKILYKGE
ScHxt6	357	SDSFETSIVLGVVNFFASTFVGIYVVERYGRRTCLLWGAASMTACMVVYASVGVTRLWPNG
ScHxt7	357	SDSFETSIVLGVVNFFASTFVGIYVVERYGRRTCLLWGAASMTACMVVYASVGVTRLWPNG
ScHxt1	357	SDSFETSIVLGVVNFFASTCCSLYTVDRFGRRNCLWGAAGMVCYVVYASVGVTRLWPNG
ScHxt3	354	SDSFETSIVLGVVNFFASTCCSLYTVDRFGRRNCLLWGAAGMVCYVVYASVGVTRLWPNG
OpHxt1	405	FGVDPNQSVCDAIIFELSLYIIFEFATTWGPCVFVVVSETYPLRIRQKGMGIAQSANWLWG
ScHxt6	417	QDQSSKAGAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIYVVVSETFPLRVKSKAMSIATAANWLWG
ScHxt7	417	QDQSSKAGAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIYVVVSETFPLRVKSKAMSIATAANWLWG
ScHxt1	417	QDQSSKAGAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIAYVVTSECFPLRVKSKMSIASAANWLWG
ScHxt3	414	EGNCSKAGAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIAYVVTSETFPLRVKSKAMSIATAANWLWG
OpHxt1	465	FLIAFFTPFITNAIHFAYGFFVFCGVVFSIFVFVAFVPEPKGLTLEEVNDQLYIDYTPGLA
ScHxt6	477	FLIGFFTPFITGAINFYGYVFMGCLVFMFFVYLLVVPETKGLTLEEVNTMWEEGVLPWK
ScHxt7	477	FLIGFFTPFITGAINFYGYVFMGCLVFMFFVYLLVVPETKGLTLEEVNTMWEEGVLPWK
ScHxt1	477	FLISFFTPFITGAINFYGYVFMGCMVFAMFYVFEFVPEPKGLSLEEVNDMYAEGVLPWK
ScHxt3	474	FLIGFFTPFITGAINFYGYVFMGCMVFAMFYVFEFVPEPKGLTLEEVNDMYAEGVLPWK
OpHxt1	525	FMISF---HK--TCHDSTEKV-----
ScHxt6	537	SASWVPPSRRGANYDAEEMAHDDKPLYKRMFSTK*
ScHxt7	537	SASWVPPSRRGANYDAEEMTHDDKPLYKRMFSTK*
ScHxt1	537	SASWVPPSKRGADYNADDLMHDDQPFYKSLFSRK*
ScHxt3	534	SASWVPTSORGANYDADALMHDDQPFYKMEGKK*

Рис. 3.1. Накладання амінокислотних послідовностей транспортерів Hxt1

*O. polymorpha* та Hxt1, Hxt3, Hxt6, Hxt7 *S. cerevisiae*. Консервативні амінокислотні залишки виділені чорним кольором, подібні – сірим кольором.

Внаслідок експресії гена *HXT1* *O. polymorpha* спостерігалось відновлення росту штаму *S. cerevisiae* з делецією гексозних транспортерів на середовищі з глюкозою [189].

### **3.1.1. Білкова інженерія гексозного транспортера Hxt1 для підвищення ефективності транспорту ксилози у дріжджів *O. polymorpha***

Ефективність збродження ксилози штамами дикого типу дріжджів *O. polymorpha* є досить низькою. З метою підвищення питомої швидкості поглинання ксилози та запобігання деградації транспортера з цитоплазматичної мембрани за відсутності глюкози було створено модифікований Hxt1 *O. polymorpha* шляхом заміни аспарагіну на аланін в положенні 358. Хоча в різних транспортерах Hxt було виявлено кілька сайтів, які сприяють зміні специфічності, найважливішим виявленим залишком є аспарагін, присутній у всіх Hxt-транспортерах. Він виконує ключову роль у розпізнаванні глюкози [65].

Пошук послідовностей нуклеотидів *O. polymorpha* був здійснений, використовуючи базу даних *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 v2.0 (<http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2>). Такий план модифікації транспортера Hxt1 *O. polymorpha* відповідав успішній модифікації транспортерів гексоз та галактози у *S. cerevisiae* [8], [9], що дозволило припустити позитивний ефект і для *O. polymorpha* (Рис. 3.2).

Геномну ДНК штаму *O. polymorpha* NCYC495 було використано як матрицю для отримання кодуєчої ділянки гена *HXT1* разом з власним термінатором за допомогою ПЛР з використанням праймерів ОК161/ОК162. Нативний промотор даного гена був замінений сильним конститутивним

промотором гена *GAP1* *O. polymorpha*, що кодує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу. Отримані фрагменти були з'єднані за допомогою overlap-ПЛР з використанням праймерів ОК159/ОК162. Ампліфікований фрагмент розміром 2,6 т. п. н. було оброблено ендонуклеазами рестрикції *XbaI* та *SphI* і клоновано у *XbaI/SphI* -лінеаризований вектор *pUC19\_zeo*, що містить ген резистентності до зеоцину як селективний маркер. Сконструйовану плазмиду *pUC19\_zeo\_HXT1* в подальшому було використано як матрицю для отримання модифікованих форм *Hxt1* (Рис. 3.3). Модифікацію було здійснено за допомогою ПЛР з використанням праймерів, в які попередньо були внесені відповідні нуклеотидні заміни. Пари праймерів ОК163/ОК164 та ОК165/ОК162 було використано для ампліфікації N- та C-фрагментів гена *HXT1* для внесення точкової заміни в положенні 358. Отримані фрагменти були з'єднані за допомогою overlap-ПЛР з використанням праймерів ОК163/ОК162. Ампліфікований фрагмент розміром 1,6 т. п. н. було оброблено ендонуклеазами рестрикції *NotI* та *SphI* і клоновано у *NotI/SphI* -лінеаризований вектор *pUC19\_zeo\_HXT1* замість нативного гена *HXT1*. Сконструйована плазміда отримала назву *pUC19\_zeo\_GAP\_HXT1\_N358A\_Hp* (Рис. 3.3).

```
>Hxt1p_Op
MSNADQQSKKSDIGSVTPPPENVYEDQAHNKATLPEHQDISTGKSAMQYLGTGLLCSLIAFGGFVFGWDTGTISGFVNMP
DFKNRFGQINGEGERYLSNVRTGLMISIFNIGCALGGLTLGRLADSKGRKVGIMLTMIVYIVGIVIQIASITSWVQFFIG
RIISGLAVGSVSVLCPMFISETSPKEIRGALVSSYQLMITLGIPLGCTTYGTYHNYDDSRQWRIPGLGCFWALLMIFG
MTFMPESPRYLIEKDRLEDAKRSLAKVKNKVEIDSEFVEHEAAIILNSIEIERQAGSASWGELFTGKPKIFYRLFVGVILQ
SLQQLSGDNYFFYYGTTIFKSVGLTDSFETSIVLGVVNFNFASTIGSLFVVDRFGRRFTLIGGGIGMAVCLVIFAAIGTKIL
YKGEFGVDPNQSVGDAMIFLSCLYIFFFATTWGPCVFVVVSETYPLRIRQKGMGIAQSANWLVGFLIAFFTFPITNAIHF
AYGFVFFGCVVFSIFFVFAFVPETKGLTLEEVDQLYIDYTPGLAFMTSFHKTQHDSTEKV
```

Рис. 3.2. Амінокислотна послідовність *Hxt1* *O. polymorpha*. Залишки лізину, що є потенційними сайтами убіквітинування, позначені сірим кольором. Підкреслено положення залишку аспарагіну, що був замінений на аланін для отримання мутанта *Hxt1-N358A*.

Крім того, одним із основних сигнальних шляхів для деградації низькоспорідненого транспортера гексози Hxt1 є убіквітин-залежний протеоліз. Об'єктом убіквітинування є залишки лізину у N-кінцевому домені вищевказаного Hxt1 білка (Рис. 3.2). Для виявлення потенційних сайтів убіквітинування було використано програмне забезпечення UbPred (<http://www.ubpred.org>).

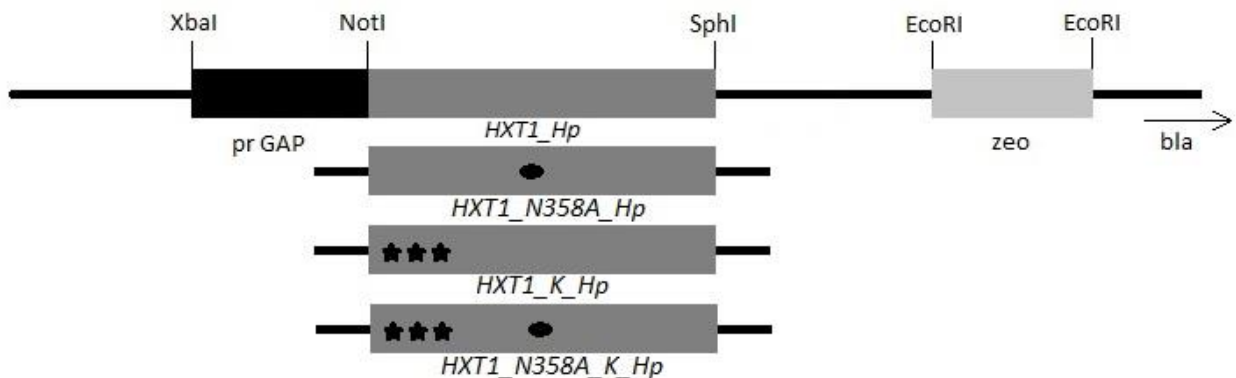


Рис. 3.3. Лінійні схеми плазмід pUC19\_zeo\_GAP\_HXT1, pUC19\_zeo\_GAP\_HXT1\_N358A, pUC19\_zeo\_GAP\_HXT1\_K, pUC19\_zeo\_GAP\_HXT1\_N358A\_K: prGAP – промотор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; Zeo – ген стійкості до зеоцину; *HXT1* – ген транспортера *O. polymorpha*; *HXT1\_N358A* – модифікований ген транспортера в положенні 358 шляхом заміни залишку аспарагіну на аланін; *HXT1\_K* – модифікований ген транспортера по сайтах убіквітинування; *HXT1\_N358A\_K* – модифікований ген транспортера по сайтах убіквітинування та заміною в положенні 358 [11].

Залишки лізину на N-кінці білка в положенні 8, 9 та 30 було ідентифіковано як сайти убіквітинування з високою ймовірністю. Заміну залишків лізину на залишки аргініну було здійснено за допомогою ПЛР. Пари праймерів ОК159/ОК167 та ОК166/ОК162 було використано для ампліфікації промотора

гена *GAP1* з N-фрагментом гена *HXT1* та С-фрагменту гена *HXT1*, відповідно. Отримані фрагменти були з'єднані за допомогою overlap-ПЛР з використанням праймерів ОК159/ОК162. Ампліфікований фрагмент розміром 2,6 т. п. н. було оброблено ендонуклеазами рестрикції *XbaI* та *SphI* і клоновано у *XbaI/SphI*-лінеаризований вектор pUC19\_zeo. Сконструйована плазмідна отримала назву pUC19\_zeo\_GAP\_HXT1\_K\_Hp (Рис. 3.3).

Варіант гена *HXT1*, що містить одночасно точкову заміну в положенні 358 та заміни потенційних сайтів убіквітинування було отримано за допомогою ПЛР з використанням праймерів ОК163/ОК164 та ОК165/ОК162 і плазмиди pUC19\_zeo\_HXT1\_K як матриці для ампліфікації. Отримані фрагменти були з'єднані за допомогою overlap-ПЛР з використанням праймерів ОК163/ОК162.

Ампліфікований фрагмент розміром 1,6 т. п. н. було оброблено ендонуклеазами рестрикції *NotI* та *SphI* і клоновано у *NotI/SphI*-лінеаризований вектор pUC19\_zeo\_HXT1 замість нативного гена *HXT1*. Сконструйована плазмідна отримала назву pUC19\_zeo\_GAP\_HXT1\_N358A\_K (Рис. 3.3).

### **3.1.2. Посилення експресії модифікованих форм *Hxt1* в геномі *hxt1Δ* мутанта *O. polymorpha***

Отримані плазмідні вектори було введено в геном мутантних дріжджів *O. polymorpha hxt1Δ* за допомогою методу електропорації та досліджено вплив модифікацій на ефективність одночасного споживання ксилози і глюкози під час високотемпературного спиртового бродіння. Алкогольну ферментацію здійснювали за умов обмеженої аерації протягом 4 діб при 45 °С в рідкому мінімальному середовищі YNB з 10% ксилози і 10% глюкози; 5% ксилози та 5% глюкози; 7% ксилози та 3% глюкози, а також 3% ксилози та 7% глюкози. Останнє співвідношення цукрів є найбільш наближеним до вмісту цих сполук в гідролізатах лігноцелюлози [190, 191]. Вміст ксилози та глюкози в середовищі

визначали методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC, PerkinElmer, Series 2000, USA) (Рис. 3.4, Рис. 3.5, Рис. 3.6).

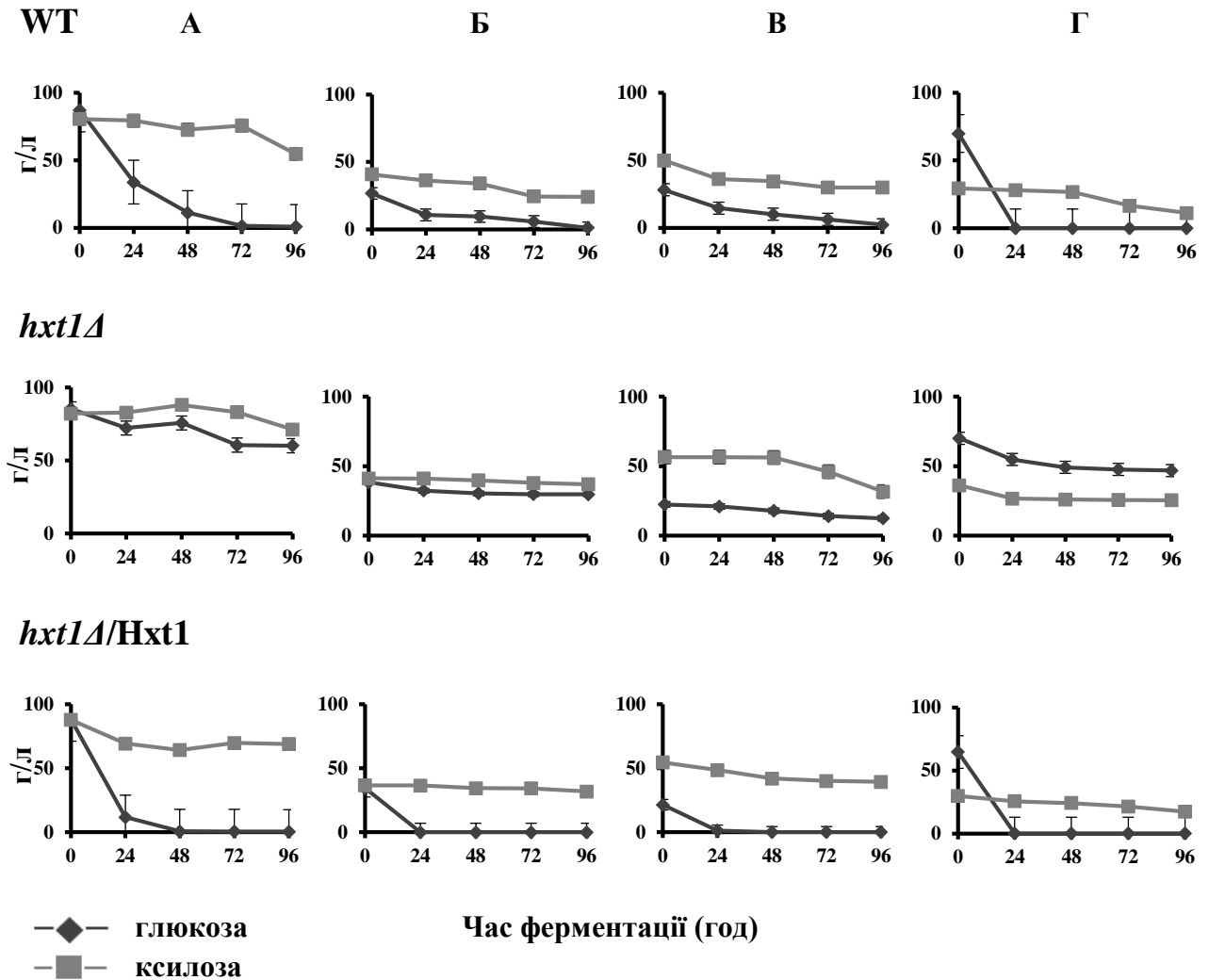
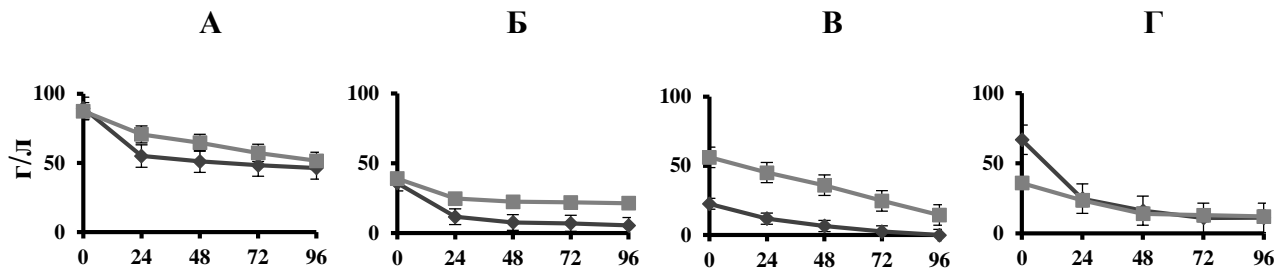


Рис. 3.4. Споживання глюкози та ксилози штамом дикого типу (WT), мутантом *hxt1Δ* та отриманим трансформантом *hxt1Δ/Hxt1*, під час збродження ксилози та глюкози при 45°C А) 10% ксилоза/10% глюкоза Б) 5% ксилоза/5% глюкоза В) 7% ксилоза/3% глюкоза Г) 7% глюкоза/3% ксилоза [11].

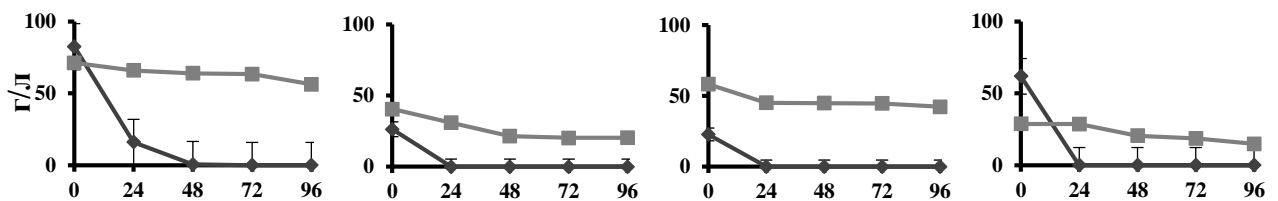
Під час бродіння у всіх тестових середовищах спостерігалось послідовне споживання глюкози та ксилози штамом дикого типу. Штам дикого типу утилізував глюкозу в повному обсязі, в той час як споживання ксилози

відбувалося лише на 40% - 60%. Мутант *hxt1Δ* практично не утилізував глюкозу та ксилозу незалежно від співвідношення цих цукрів у середовищі, внаслідок чого не утворював етанол в умовах алкогольної ферментації (Рис. 3.4).

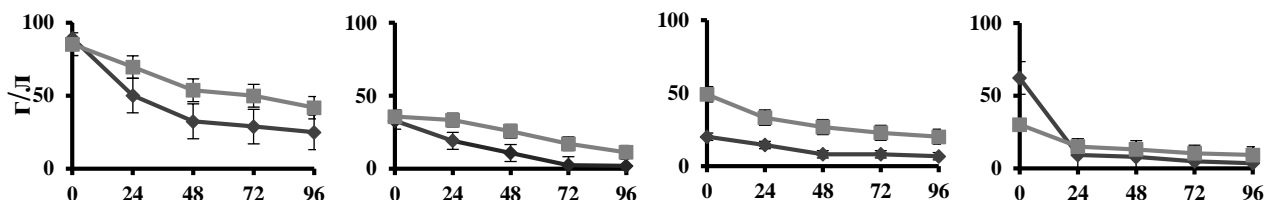
### *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*



### *hxt1Δ/Hxt1\_K*



### *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K*



—◆— глюкоза  
—■— ксилоза

Час ферментації (год)

Рис. 3.5. Споживання глюкози та ксилози отриманими трансформантами *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*, *hxt1Δ/Hxt1\_K*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* під час зброджування ксилози та глюкози при 45°C А) 10% ксилоза/10% глюкоза Б) 5% ксилоза/5% глюкоза В) 7% ксилоза/3% глюкоза Г) 7% глюкоза/3% ксилоза [11].



Внаслідок посилення експресії нативного *HXT1* в геномі *hxt1Δ* мутанта спостерігалось відновлення здатності до споживання цукрів, проте, швидкість споживання ксилози у штамів WT та *hxt1Δ/Hxt1* суттєво не відрізнялася. Натомість, швидкість споживання ксилози штамом *hxt1Δ/Hxt1* була нижчою порівняно із штамами, що містять модифіковані версії *HXT1* (Рис. 3.4, Рис. 3.5). Динаміка споживання цукрів штамом *hxt1Δ/Hxt1\_K* суттєво не відрізнялася від штамів WT та *hxt1Δ/Hxt1*. Найбільш інтенсивне споживання ксилози здійснювалось штамом *hxt1Δ/Hxt1\_N358A* (Рис. 3.5).

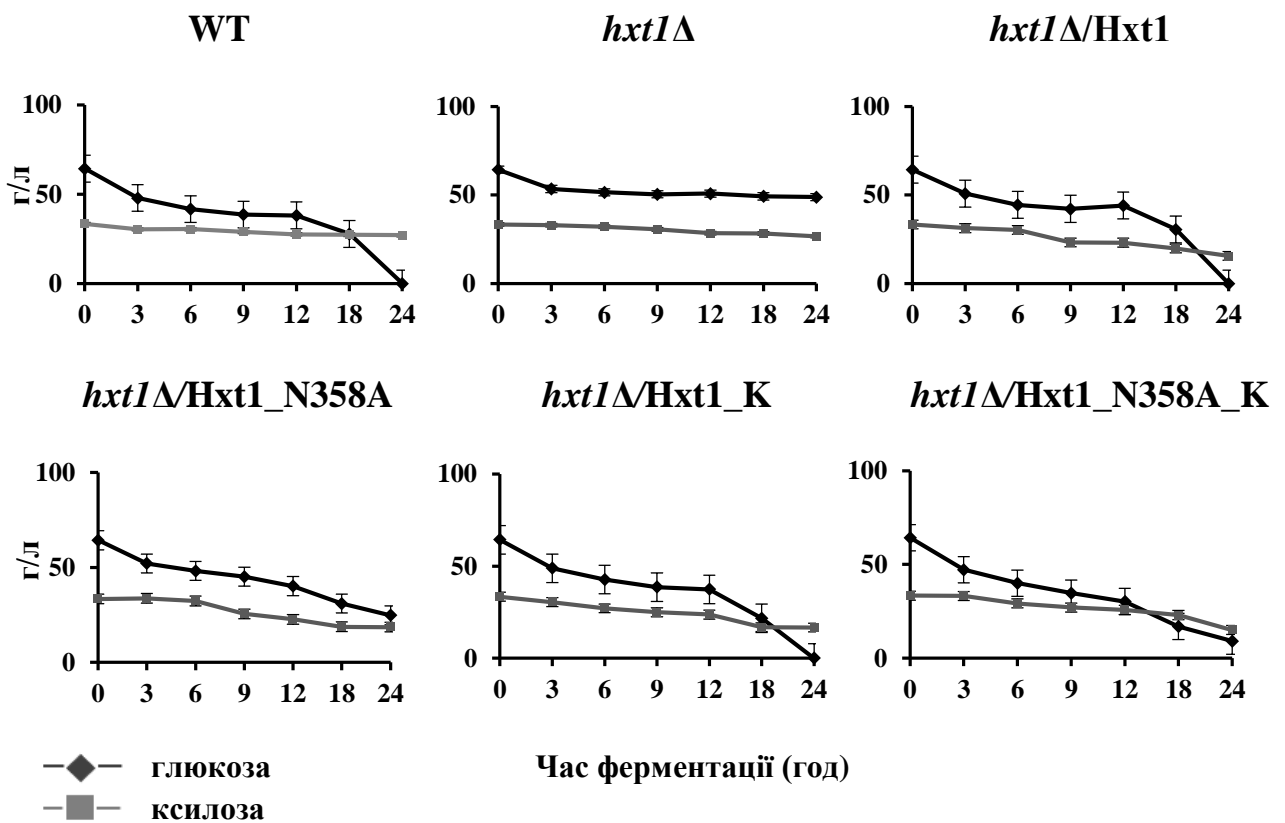


Рис. 3.6. Споживання глюкози та ксилози штамом дикого типу (WT), мутантом *hxt1Δ* та отриманими трансформантами *hxt1Δ/Hxt1*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*, *hxt1Δ/Hxt1\_K*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* під час алкогольного бродіння при 45°C у середовищі з 7% глюкози та 3% ксилози протягом 24 год [11].

Проте, найбільш виражене спільне споживання глюкози та ксилози спостерігалось у штаму *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K*, який містив обидві модифікації, зокрема при концентрації 7% глюкози та 3% ксилози, вміст ксилози зменшився за 1 добу до  $14,100 \pm 0,175$  г/л при вихідному вмісті  $30,5 \pm 0,35$  г/л. Однак, за 96 годин ферментації штаму *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* повністю не утилізував ксилозу (Рис. 3.5).

Протягом 24 год бродіння в середовищі із 7% глюкози та 3% ксилози, штаму *Hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* споживав 87% глюкози та 50% ксилози, тоді як *hxt1Δ/Hxt1\_N358A* лише 65% глюкози та 38% ксилози (Рис. 3.6).

Незважаючи на різницю в динаміці споживання цукрів між трансформантами з модифікаціями *HXT1*, всі вони характеризувалися підвищеною продукцією етанолу порівняно зі штамом дикого типу (Рис. 3.7).

### **3.1.3 Характеристика алкогольної ферментації отриманих рекомбінантних штамів *O. polymorpha* з посиленою експресією модифікованих форм *Hxt1***

Отримані рекомбінантні штами, штаму дикого типу та мутант *hxt1Δ* були проаналізовані на здатність продукувати етанол за умов високотемпературної алкогольної ферментації (Рис. 3.7, Рис. 3.8). Під час визначення рівня продукції етанолу було встановлено, що мутант *hxt1Δ* був не здатний утворювати етанол в середовищі з ксилозою та глюкозою в умовах спиртового бродіння, а у всіх досліджуваних штамів *O. polymorpha* *hxt1Δ/Hxt1*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*, *hxt1Δ/Hxt1\_K*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* рівень утвореного етанолу суттєво не відрізнявся від штаму дикого типу (Рис. 3.7, Рис. 3.8).

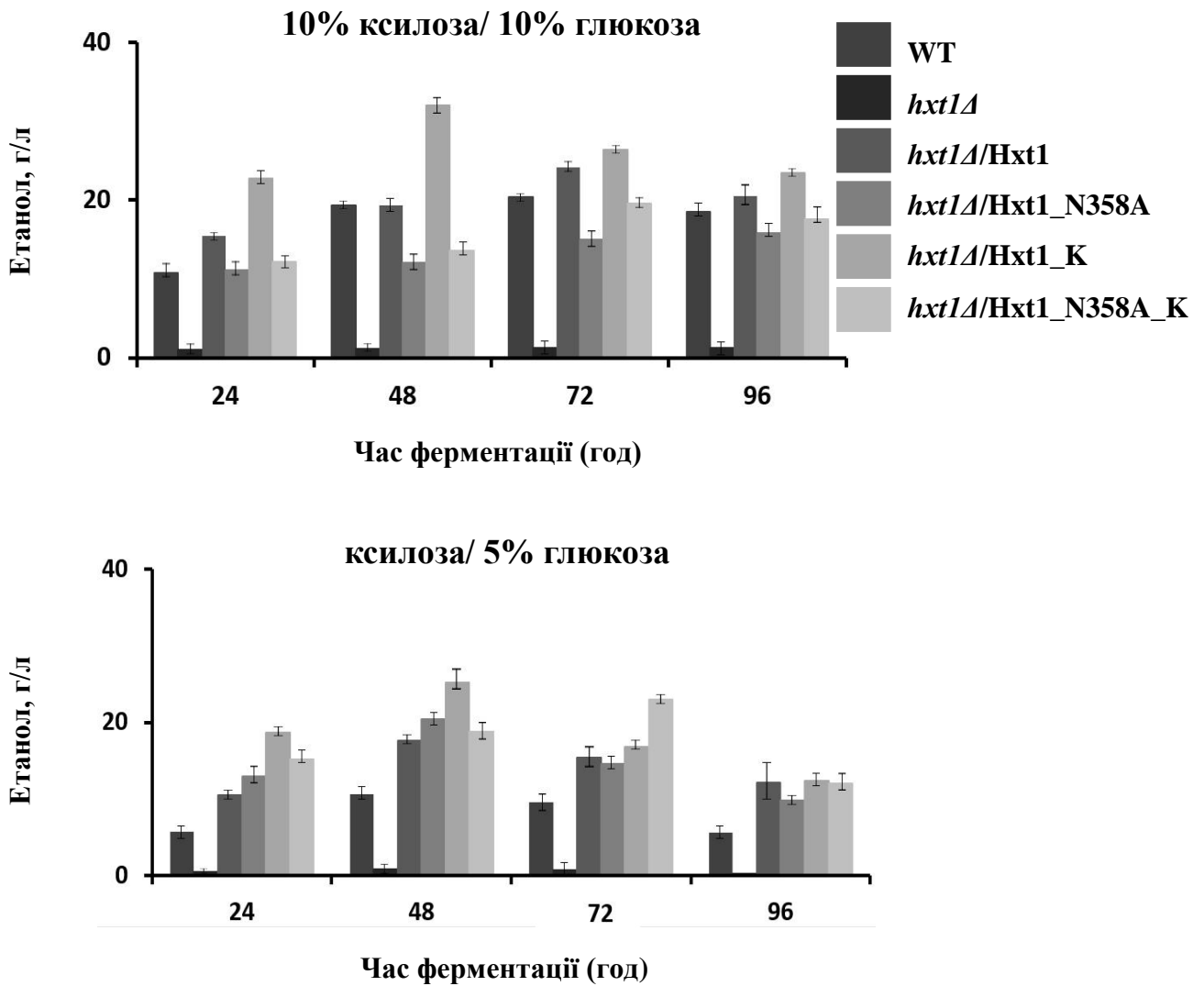


Рис. 3.7. Продукція етанолу штамом дикого типу (WT), мутантом *hxt1Δ* та отриманими штамми *hxt1Δ/Hxt1*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*, *hxt1Δ/Hxt1\_K*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* під час спиртового бродіння при 45°C у середовищі з 10% глюкози/10% ксилози та 5% глюкози/5% ксилози [11].

Однак, в середовищі з 7% глюкози та 3% ксилози надекспресія нативної або модифікованих версій *HXT1* у *hxt1Δ* мутанті обумовлювала до 30% збільшення продукції етанолу на 48 год та 72 год спиртового бродіння порівняно зі штамом дикого типу.

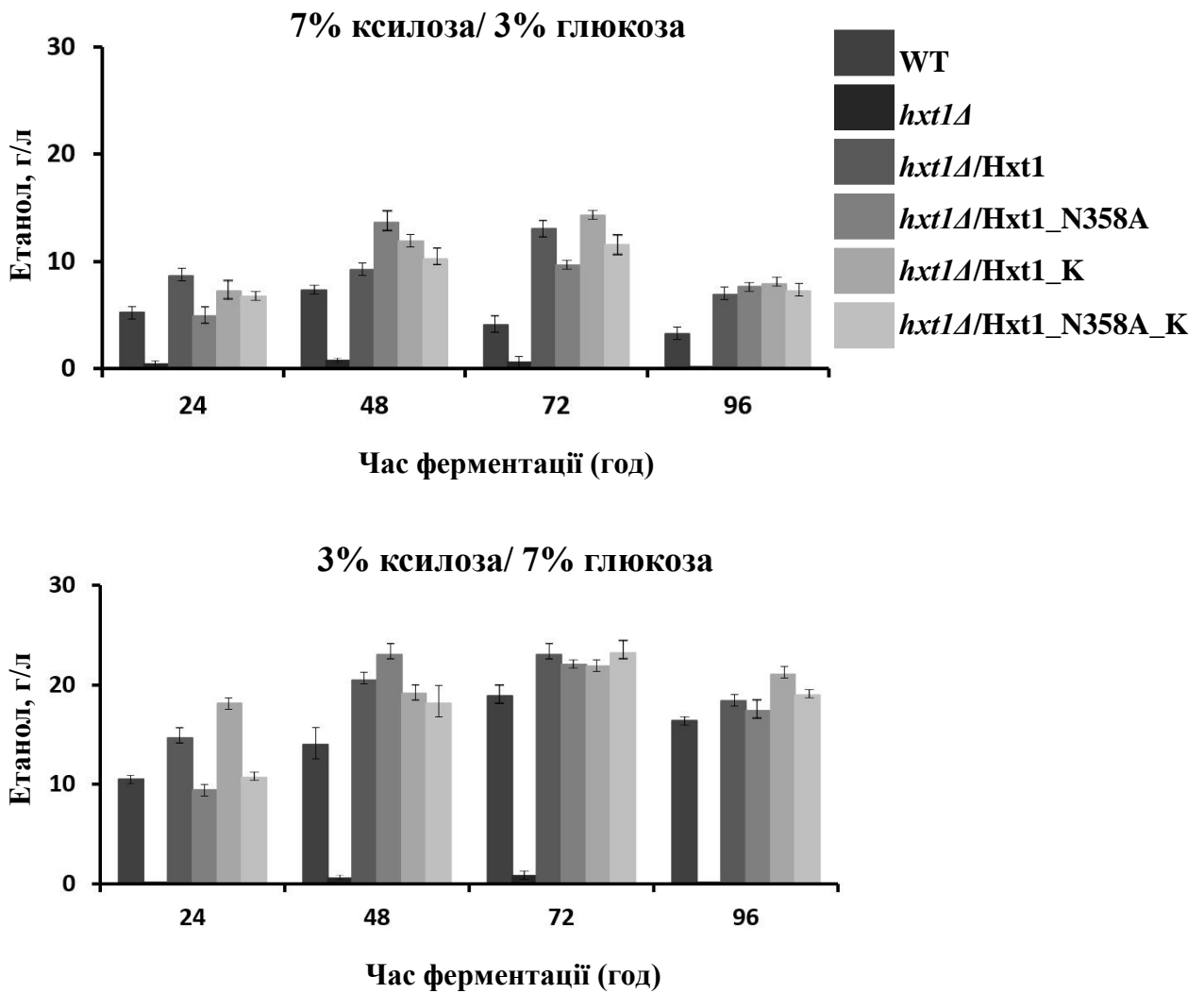


Рис. 3.8. Продукція етанолу штамом дикого типу (WT), мутантом *hxt1Δ* та отриманими штамми *hxt1Δ/Hxt1*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*, *hxt1Δ/Hxt1\_K*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* під час спиртового бродіння при 45°C у середовищі 3% глюкози/ 7% ксилози та 7% глюкози/ 3% ксилози [11].

Протягом 24 год ферментації найбільша кількість етанолу накопичувалося штамми *hxt1Δ/Hxt1\_K* та *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* (Рис. 3.9). Проте, *hxt1Δ/Hxt1\_K* за 24 год споживав всю глюкозу і лише незначну кількість ксилози, в той час як *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* спільно використовував обидва цукри з середовища. Тому для подальших дослідження був обраний варіант *Hxt1\_N358A\_K*.

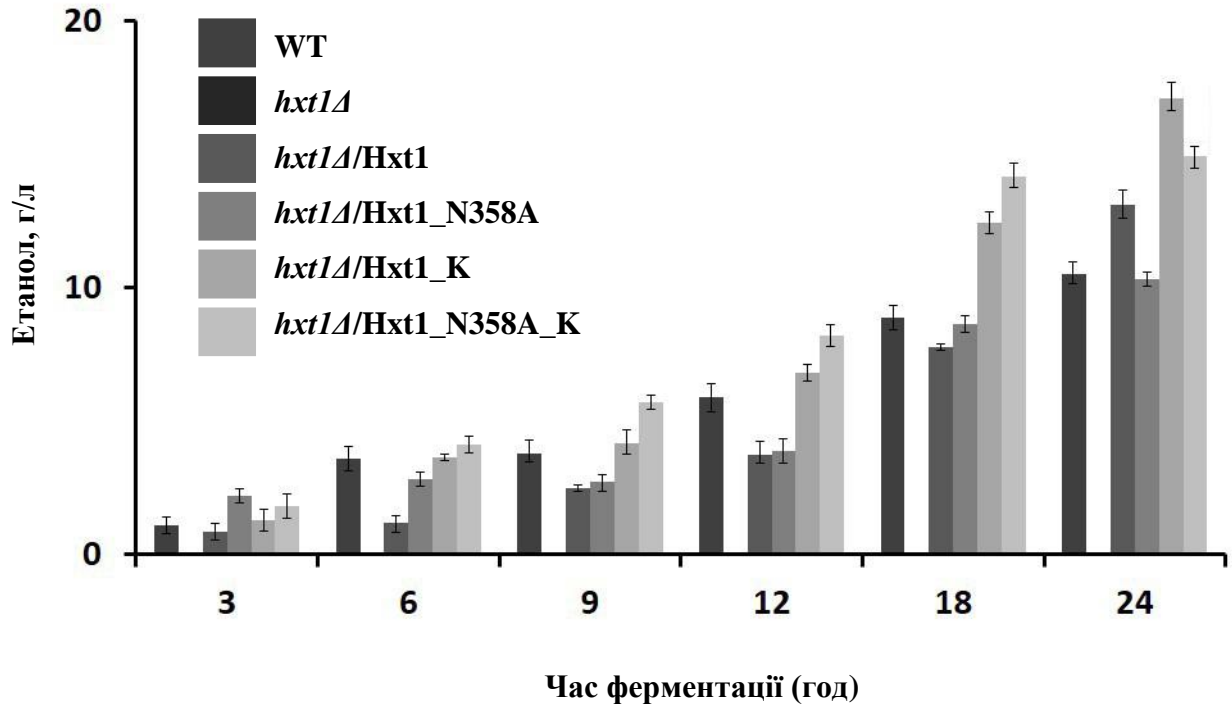


Рис. 3.9. Продукція етанолу штамом дикого типу (WT), мутантним *hxt1Δ* та отриманими штамми *hxt1Δ/Hxt1*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*, *hxt1Δ/Hxt1\_K*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* під час спиртового бродіння при 45°C у середовищі з 7% глюкозою та 3% ксилозою протягом 24 год [11].

Додатково для дослідження біологічного впливу гена *HXT1* на метаболізм глюкози та ксилози, проведено перевірку росту штамів дріжджів *O. polymorpha hxt1Δ*, *O. polymorpha hxt1Δ/Hxt1* у рідкому мінімальному середовищі YNB з різними концентраціями ксилози та глюкози в порівнянні зі штамми дикого типу NCYC495 *leu1-1* (WT), ауксотроф за лейцином, та із прототрофним штамом *O. polymorpha* NCYC495 *leu1-1/ScLEU2* (WTpt).

Аналіз фенотипу делеційного мутанта показав, що *hxt1Δ* характеризувався незначним пошкодженням росту при низькій концентрації глюкози та ксилози (0,1 %), проте на вищих концентраціях цукрів (1% та 5%) ріст *hxt1Δ* мутанта був значно кращим ніж NCYC495 *leu1-1* (Рис. 3.10). Наслідком пошкодження росту

на низькій концентрації цукрів може бути дефект транспорту цих цукрів, обумовлений делецією гена *HXT1*.

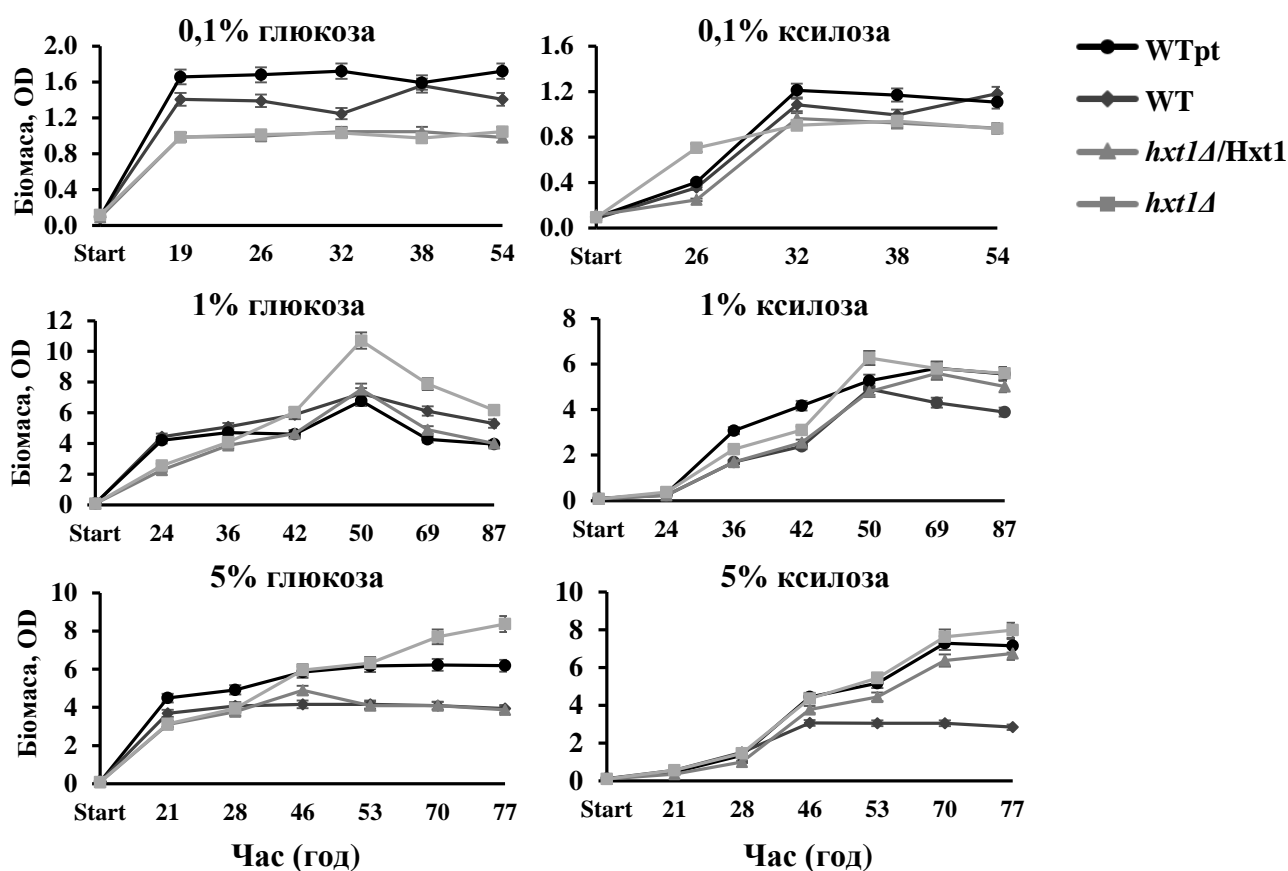


Рис. 3.10. Дослідження росту штамів дріжджів *O. polymorpha hxt1Δ/N*, *O. polymorpha hxt1Δ*, ауксотрофного штаму дріжджів *O. polymorpha WT* та прототрофного штаму дріжджів *O. polymorpha WTpt* в рідкому мінімальному середовищі YNB з різними концентраціями ксилози та глюкози (0,1 %, 1%, 5%),  $p \leq 0,005$ .

Отже, внаслідок модифікації транспортера Hxt1 *O. polymorpha* за рахунок заміни залишків лізину на N-кінці білка (заміна сайтів убіквітинування) та заміни аспарагіну на аланін в положенні 358, було отримано штами дріжджів *O. polymorpha* з посиленою експресією ізоформ гена *HXT1*, що кодують нативну та модифіковані форми транспортера Hxt1. Це дало змогу продемонструвати

позитивний ефект модифікацій власних транспортерів *O. polymorpha* на здатність утилізувати ксилози в присутності глюкози та на продукцію етанолу в отриманих рекомбінантних штаммах.

### 3.1.4 Аналіз локалізації гібридного білка Hxt1-GFP в клітинах *O. polymorpha* за допомогою флуоресцентної мікроскопії

З метою порівняння тривалості локалізації нативної та модифікованої форм транспорта Hxt1 у цитоплазматичній мембрані було здійснено злиття Hxt1 та Hxt1\_N358A\_K на С-кінці з флуоресцентним репортерним білком GFP (Рис. 3.11, Рис. 3.12).

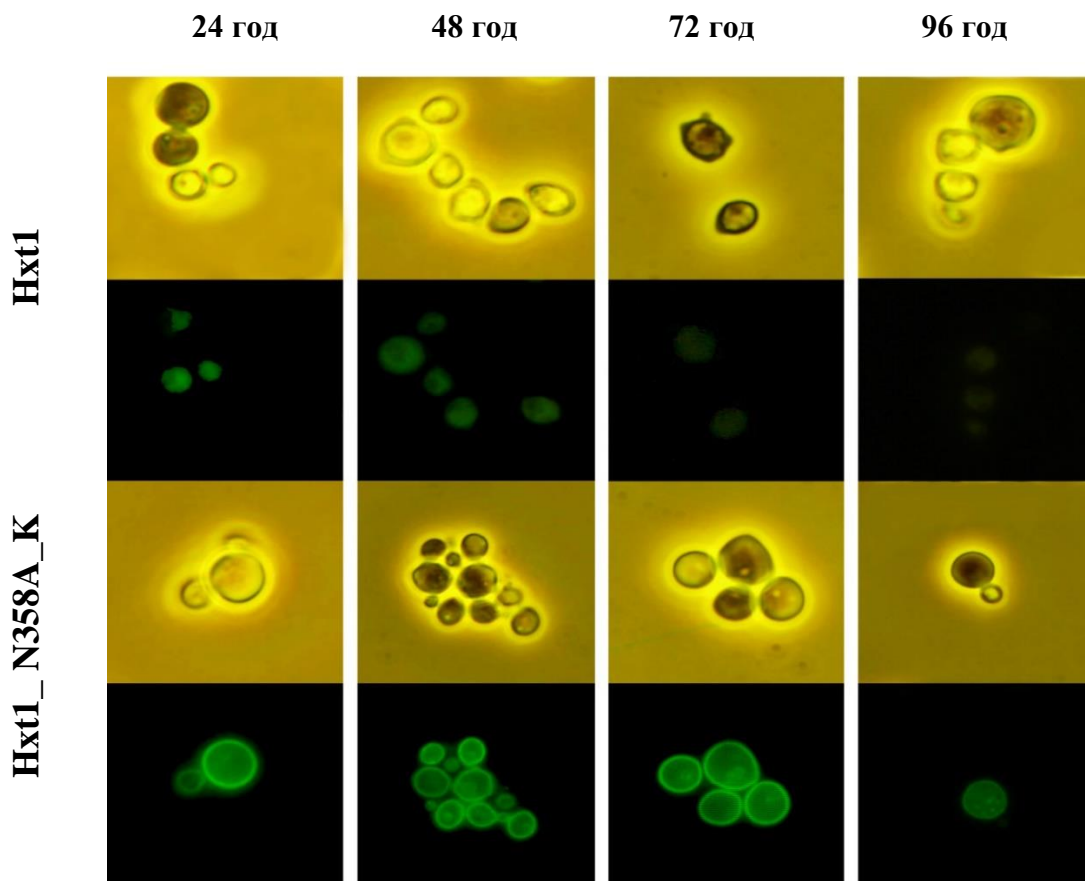


Рис. 3.11. Мембранна локалізація Hxt1 та Hxt1\_N358A\_K, злитих з зеленим флуоресцентним білком GFP, під час росту на мінімальному середовищі з 2% ксилозою [11].

За допомогою флуоресцентної мікроскопії проведено оцінку локалізації в мембрані мутанта *hxt1Δ O. polymorpha* злитих білків із нативним та модифікованим транспортером через 24 год., 48 год., 72 год. та 96 год. культивування за аеробних умов у мінімальному середовищі із 2% ксилози (Рис. 3.11) або 2% глюкози (Рис. 3.12).

Встановлено, що Hxt1\_N358A\_K-GFP локалізувалися на плазматичній мембрані навіть після 96 год культивування в мінімальному середовищі з ксилозою, в той час як нативний Hxt1-GFP швидко деградував та видалявся з плазматичної мембрани.

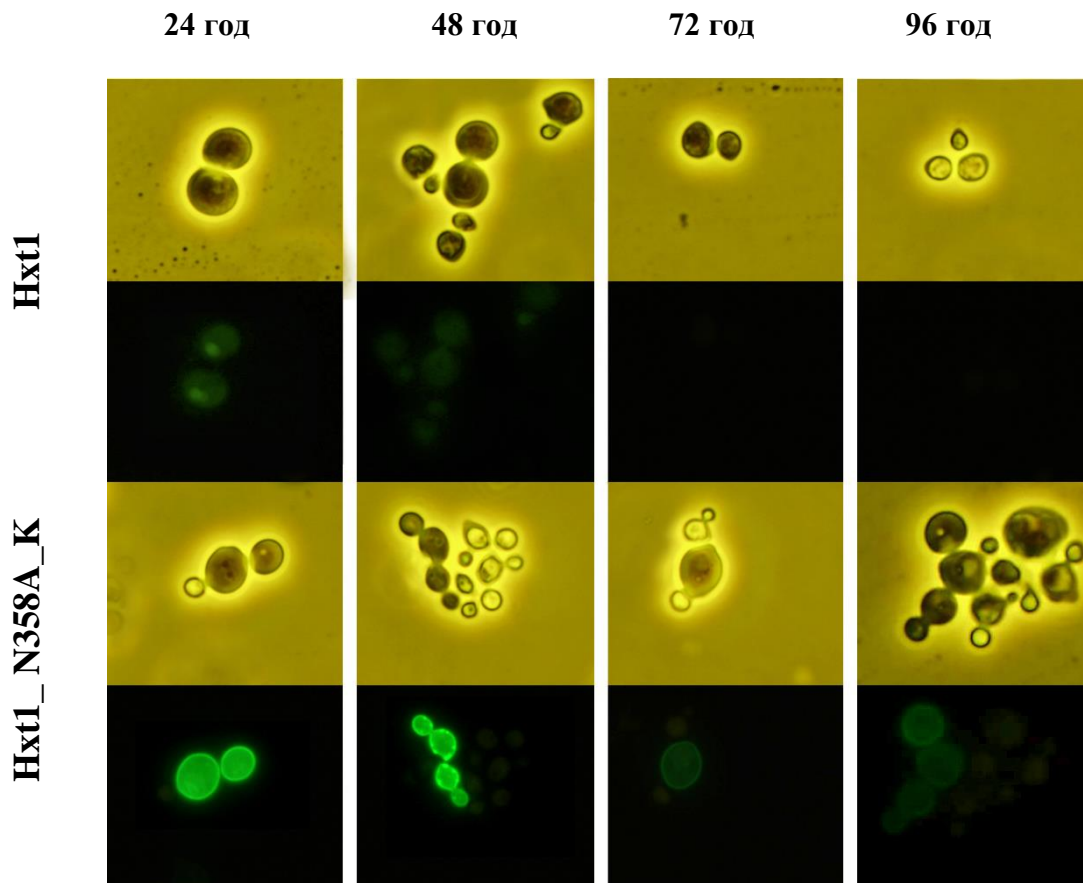


Рис. 3.12. Мембранна локалізація Hxt1 та Hxt1\_N358A\_K, злитих з зеленим флуоресцентним білком GFP, під час росту на мінімальному середовищі з 2% глюкозою [11].



Різниця в тривалості локалізації модифікованої форми білка спостерігалася також і в середовищі з глюкозою, проте, під час росту на глюкозі в обох випадках білок Hxt1 зазнавав більш швидкої деградації (Рис 3.12).

Таким чином, мутагенез трьох залишків лізину в Hxt1 має вагомий вплив на стабільність мембранної локалізації Hxt1. У свою чергу більш тривала локалізація білка в мембрані за умов алкогольної ферментації у середовищі з ксилозою та глюкозою ймовірно обумовлює поліпшену кінетику споживання ксилози та як наслідок підвищення продукції етанолу.

### **3.1.5. Посилення експресії модифікованого ендogenousного транспортера Hxt1 та модифікованих гетерологічних транспортерів Gal2 та Hxt7 *S. cerevisiae* в геномі покращеного продуцента етанолу з ксилози *O. polymorpha***

Відомі численні спроби експресії гетерологічних транспортерів ксилози у *S. cerevisiae*. Серед них Sut1, Sut2, Xut1, Xut3 (Xyp33), Xut4, Xyp29 (STL12), Sut3 (Xyp37) з *S. stipitis*, Gxs1 та Gxf1 з *C. intermedia*, At5g59250 з *A. thaliana*, An29-2 і An25 з *Neurospora crassa*, xtrD з *Aspergillus nidulans*, MgT05196 з *Meyerozyma guilliermondii* та Xylh з *Debaryomyces hansenii* відновлювали здатність *S. cerevisiae* із делецією транспортерів родини Hxt транспортувати ксилозу. Три з них були описані як транспортери специфічні лише для ксилози: An25 та Xyp29 – транспортери ксилози, що не здатні поглинати глюкозу та Xut1, що здатний транспортувати глюкозу, але з дуже низькою спорідненістю [191].

Спираючись на джерела літератури, було вирішено як альтернативний спосіб підвищення ефективності транспорту ксилози здійснити експресію гетерологічних транспортерів в *O. polymorpha*. Проте, проблемою такого підходу є забезпечення правильної локалізації гетерологічних білків в цитоплазматичній мембрані. Відомо, що з метою усунення інгібуючого впливу глюкози на

утилізацію ксилози в *S. cerevisiae* успішно було модифіковано транспортери Hxt7 та Gal2, які є основними транспортерами, що забезпечують поглинання ксилози в умовах, коли ксилоза є єдиним джерелом Карбону або під час коферментації обидвох цукрів за низького рівня глюкози. Висока концентрація глюкози репресує транскрипцію *HXT7* і *GAL2*, одночасно активуючи транскрипцію *HXT1*.

Для отримання рекомбінантних штамів дріжджів *O. polymorpha* з експресією генів Hxt7 та Gal2, що відповідають за транспорт гексоз у дріжджів *S. cerevisiae*, було сконструйовано плазмиди pUC19/prGAP\_HXT7/NTC та pUC19/prGAP\_GAL2/NTC, відповідно. За допомогою сайт-специфічного мутагенезу було здійснено заміну амінокислотних залишків аспарагіну на серин у положенні 370 Hxt7 [72]. Модифікацію було проведено за допомогою ПЛР з використанням праймерів, в які попередньо були внесені відповідні нуклеотидні заміни. Пари праймерів ОК203/ОК204 та ОК205/ОК217 було використано для ампліфікації N- та С-фрагментів гена *HXT7* з геномної ДНК штаму дикого типу *S. cerevisiae* ВУ4742. Отримані фрагменти були з'єднані за допомогою overlap-ПЛР з використанням праймерів ОК203/ОК217. Ампліфікований фрагмент розміром 1,7 т. п. н. було оброблено ендонуклеазою рестрикції XbaI і клоновано у XbaI -лінеаризований та дефосфорильований вектор pUC19/prGAP/NTC. В результаті було отримано плазмиду pUC19/prGAP\_HXT7/NTC (Рис. 3.13).



Рис. 3.13. Лінійна схема плазмідного вектора pUC19/prGAP\_HXT7/NTC. prGAP – промотор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; GAPtr –

термінатор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; NTC – ген стійкості до норзеотрицину; *HXT7\_N370A\_Sc* – модифікований ген транспортера Hxt7 *S.cerevisiae* [11].

За допомогою сайт-специфічного мутагенезу було здійснено заміну амінокислотних залишків аспарагіну на фенілаланін в положенні 376 Gal2. Модифікацію було проведено за допомогою ПЛР з використанням праймерів, які попередньо були внесені відповідні нуклеотидні заміни. Пари праймерів ОК207/ОК208 та ОК209/ОК218 було використано для ампліфікації N- та С-фрагментів гена *GAL2* з геномної ДНК *S. cerevisiae* BY4742. Отримані фрагменти були з'єднані за допомогою overlap-ПЛР з використанням праймерів ОК207/ОК218. Ампліфікований фрагмент розміром 1,7 т. п. н. було оброблено ендонуклеазою рестрикції *XbaI* і клоновано у *XbaI*-лінеаризований та дефосфорильований вектор pUC19/prGAP/NTC. В результаті була отримана плазміда pUC19/prGAP\_GAL2/NTC (Рис. 3.14).



Рис. 3.14. Лінійна схема плазмідного вектора pUC19/prGAP\_GAL2/NTC. prGAP – промотор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; GAPtr – термінатор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; NTC – ген стійкості до норзеотрицину; *GAL2\_N367F\_Sc* – модифікований ген транспортера Gal2 *S. cerevisiae* [11].

Для ампліфікації кодуючої ділянки гена *HXT1* з внесеною точковою заміною та заміненними потенційними сайтами убіквітинування було використано пару праймерів ОК161/ОК216 та плазмиду pUC19\_zeo\_HXT1\_N358A\_K як матрицю для ПЛР. Ампліфікований фрагмент розміром 1,6 т.п.н. було оброблено ендонуклеазою рестрикції XbaI і клоновано у XbaI-лінеаризований та дефосфорильований вектор pUC19\_prGAP\_NTC. Сконструйована плазміда отримала назву pUC19\_prGAP\_NTC\_HXT1\_N358A\_K (Рис. 3.15).

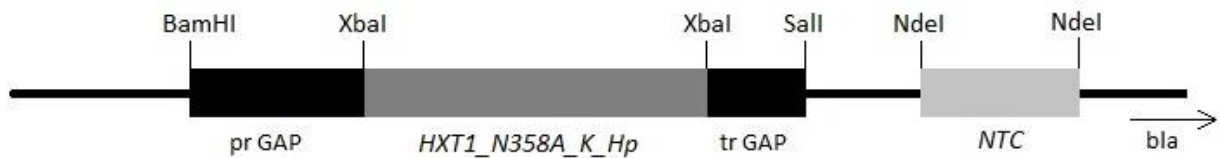


Рис. 3.15. Лінійна схема плазмиди для посилення експресії модифікованої версії транспортера Hxt1. prGAP – промотор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; GAPtr – термінатор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; NTC – ген стійкості до норзеотрицину; *HXT1\_N358A\_K* – модифікований ген транспортера Gal2 *S.cerevisiae* [11].

Коректність конструювання векторів було перевірено за допомогою ПЛР. Отримані плазмиди з модифікованими транспортерами Gal2 та Hxt7 *S. cerevisiae*, а також Hxt1 *O. polymorpha* було введено в геном одного з найкращих продуцентів етанолу *O. polymorpha* (BEP/cat8Δ) [5] за допомогою методу електропорації та досліджено вплив модифікацій на ефективність спільного використання субстрату під час високотемпературного спиртового бродіння. Для отримання стабільних рекомбінантних штамів трансформанти культивували

в неселективних умовах із подальшим відбором клонів, які зберігають здатність рости на середовищі з додаванням норзеотрицину.

За допомогою ПЛР у реальному часі було підтверджено підвищення рівня експресії генів, що кодують модифіковані транспортери (Рис. 3.16).

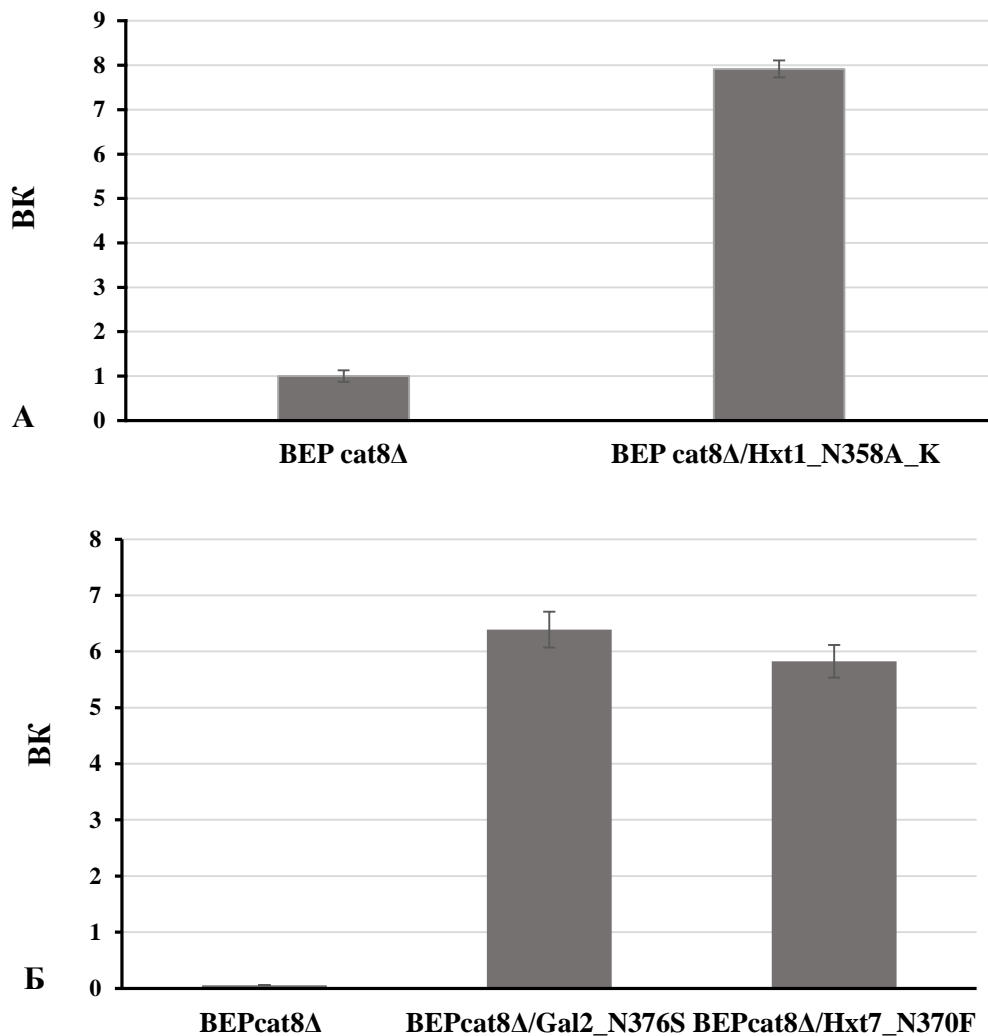


Рис. 3.16. Рівень експресії модифікованого гена *HXT1* (HXT1\_N358A\_K) (А) та гетерологічних генів *GAL2* (GAL2\_N376F) і *HXT7* (Hxt7\_N370F) (Б) у рекомбінантних штаммах *O. polymorpha* в порівнянні із батьківським штамом BEPcat8Δ на другу добу алкогольної ферментації глюкози при 45°C. Праймери

для гена *ACT1*, що кодує актин, були використані як контроль. ВК – відносна кількість.

Експресія *HXT1* у штамі *VERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* була підвищена у 8 разів порівняно із штамами *VERcat8Δ* та *VERcat8Δ/Gal2\_N376S* (Рис. 3.15 А). Експресія *HXT7* у *VERcat8Δ/Hxt7\_N370F* та *GAL2* у штаммах *VERcat8Δ/Gal2\_N376S* була підвищена у 6 разів (Рис. 3.15 Б). Відповідні рекомбінантні штами були використані для подальшого дослідження впливу внесених модифікацій на ефективність спільного використання субстрату під час високотемпературного спиртового бродіння.

### **3.1.6. Характеристика алкогольної ферментації отриманих рекомбінантних штамів *O. polymorpha* з посиленою експресією модифікованих транспортерів *Hxt1*, *Gal2* та *Hxt7***

Під час спиртового бродіння при 45 °С у середовищі з 10% ксилозою як єдиним джерелом Карбону штам, який містив модифікації в *Hxt1* характеризувався найкращою динамікою споживання ксилози (Рис. 3.17 А).

Протягом 96 годин ферментації штам *VERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* споживав на 49% більше ксилози в порівнянні із батьківським штамом. Штам *VERcat8Δ/Hxt7\_N370F* протягом 48 годин ферментації споживав ксилозу повільніше, ніж штам дикого типу, але після 96 годин імпорт ксилози було покращено на 20%, як і в штаму *VERcat8Δ/Gal2\_N376S* (Рис. 3.17 Б).

Штам *VERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* характеризувався підвищеною продукцією етанолу на 48 год та 72 год ферментації в мініальному середовищі із додаванням 10% ксилози, у той час як продукція етанолу штамами *VERcat8Δ/Hxt7\_N370F* та *VERcat8Δ/Gal2\_N376S* не відрізнялася від штаму дикого типу. Штам

ВЕР*cat8Δ*/Hxt1\_N358A\_K утворював  $12.610 \pm 0.065$  г/л етанолу у порівнянні з  $11.430 \pm 0.151$  г/л батьківського штаму на 72 год ферментації (Рис. 3.17 Б).

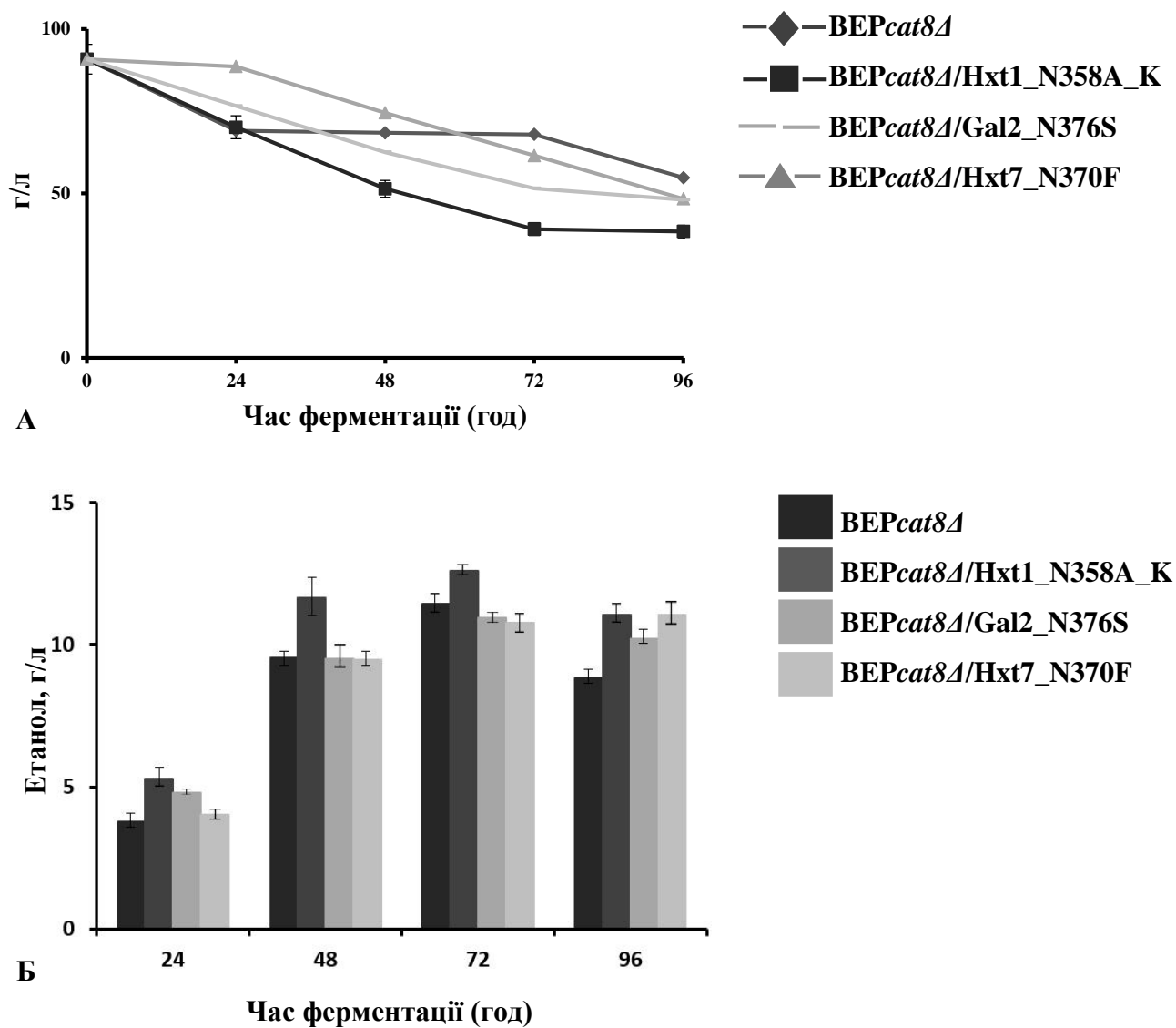


Рис. 3.17. Споживання ксилози (А) та продукція етанолу (Б) штамом ВЕР/*cat8Δ* та отриманими рекомбінантними штамами ВЕР*cat8Δ*/Hxt1\_N358A\_K, ВЕР*cat8Δ*/Gal2\_N376S, ВЕР*cat8Δ*/Hxt7\_N370F під час спиртового бродіння у середовищі з ксилозою [11].

Аналізуючи здатність одночасного споживання обох субстратів та продукцію етанолу за умов ко-ферментації, встановлено, що у батьківського штаму (*WER/cat8Δ*) та штаму із модифікацією *Hxt7* (*WERcat8Δ/Hxt7\_N370F*) спостерігається інгібування транспорту ксилози глюкозою. Вихідний штам *WERcat8Δ* протягом 48 год споживав усю наявну в тестовому середовищі глюкозу та лише 30% ксилози. Поглинання обох цукрів штамом із модифікованим *Hxt7* відбувалося подібно до батьківського штаму (Рис. 3.18.).

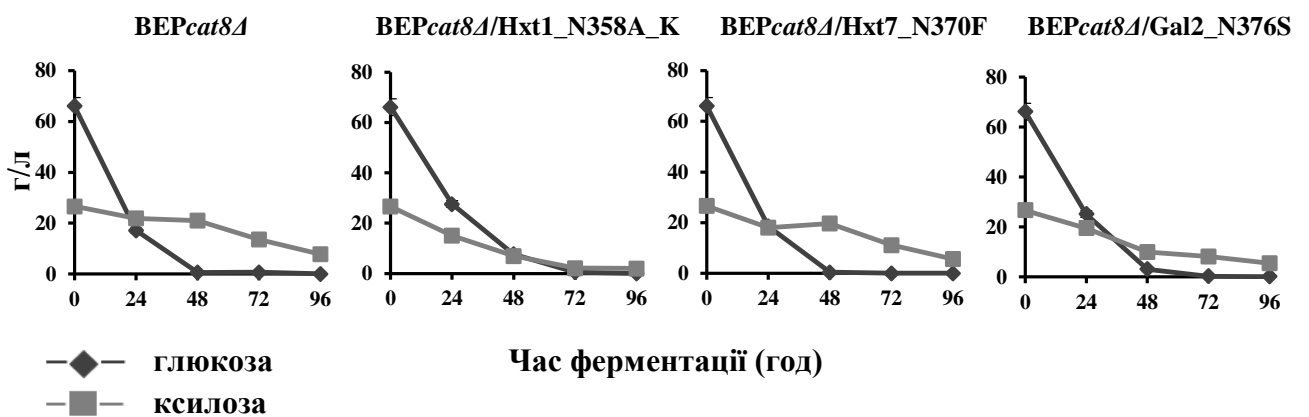


Рис. 3.18. Споживання глюкози і ксилози батьківським штамом *WER/cat8Δ* та отриманими штамми *Hxt1\_N358A\_K*, *Gal2\_N376S*, *Hxt7\_N370F* під час спиртового бродіння на середовищі з 7% глюкозою та 3% ксилізою [11].

У той же час штами, що містили модифіковані *Hxt1* і *Gal2*, споживали на 73% і 62% більше ксилізи, відповідно. Під час зброджування 7% глюкози та 3% ксилізи штамом *WERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* вміст ксилізи зменшився на 4 доби до  $2,020 \pm 0,013$  г/л при вихідному вмісті  $27,01 \pm 0,40$  г/л (Рис. 3.18).

Рівень продукції етанолу штамом *WERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* був вищим на 50% порівняно із батьківським штамом на 48 год ко-ферментації глюкози та ксилізи, а також перевищував продукцію етанолу штамми, що містили модифіковані транспортери *Gal2* та *Hxt7*, на 22% та 10%, відповідно. Продукція



етанолу штамом *WERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* досягала  $27,560 \pm 0,127$  г/л етанолу на другу добу ферментації у порівнянні з *WER/cat8Δ*, рівень продукції етанолу якого становив  $18.230 \pm 0.096$  г/л (Рис. 3.19, Табл. 3.1). Крім того, штам *WERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* мав найвищий вихід етанолу  $0,35$  г етанолу/г цукру, що на 30% більше порівняно з *WERcat8Δ* (Табл. 3.1).

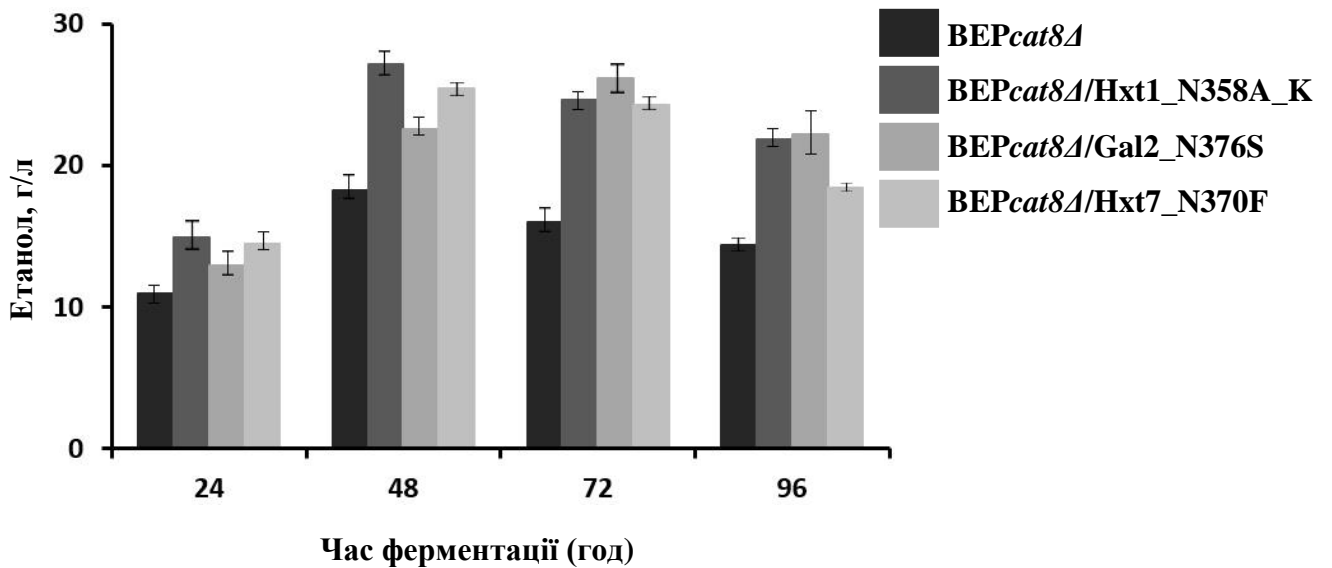


Рис. 3.19. Продукція етанолу батьківським штамом *WER/cat8Δ* та отриманими штамми *Hxt1\_N358A\_K*, *Gal2\_N376S*, *Hxt7\_N370F* під час спиртового бродіння на середовищі з 7% глюкозою та 3% ксилозою [11].

Отже, внаслідок модифікації гетерологічних транспортерів сконструйовано штами дріжджів *O. polymorpha* з модифікованим геном *HXT7 S. cerevisiae* в положенні 370 шляхом заміни аспарагіну на фенілаланін та з модифікованим геном *GAL2 S. cerevisiae* в положенні 376 шляхом заміни аспарагіну на серин та досліджено вплив здійснених модифікацій транспортерів *Hxt1*, *Hxt7* та *Gal2* на ефективність споживання ксилози та глюкози дріжджами *O. polymorpha* в умовах високотемпературної алкогольної ферментації. Встановлено, що введення модифікованих транспортерів *Hxt1 O. polymorpha* в

геном покращеного продуцента етанолу з ксилози обумовлює одночасне споживання обидвох цукрів за умов високотемпературної алкогольної ферментації 7% глюкози та 3% ксилози. Аналізуючи здатність одночасного споживання обох субстратів та продукцію етанолу за умов ко-ферментації, рекомбінантні штами, що містили модифікований транспортер Gal2 характеризувались одночасним споживанням цукрів, втім, модифікований транспортер Hxt7 залишався чутливим до субстратного інгібування глюкозою.

Таблиця 3.1

**Продуктивність і вихід етанолу у рекомбінантних штамів *O. polymorpha* порівняно із реципієнтним штамом ВЕР/*cat8Δ* на 48 год ко-ферментації глюкози та ксилози (7:3) при 45 °С**

Штами	Етанол, г/л	Вихід етанолу, г/г спожитого субстрату	Швидкість продукції етанолу, г/г біомаси/год	Продуктивність утворення етанолу, г/л/год
ВЕР/ <i>cat8Δ</i>	18,230±0,096	0,256±0,009	0,165±0,004	0,380±0,016
ВЕР <i>cat8Δ</i> / Hxt1_N358A_K	27,560±0,127	0,347±0,014	0,212±0,008	0,574±0,029
ВЕР <i>cat8Δ</i> / Gal2_N376S	22,590±0,089	0,310±0,011	0,188±0,004	0,471±0,019
ВЕР <i>cat8Δ</i> / Hxt7_N370F	25,440±0,065	0,319±0,014	0,203±0,007	0,530±0,024

Також було проведено дослідження закислювальної активності клітин рекомбінантних штамів *O. polymorpha* з посиленою експресією модифікованих

транспортерів Hxt1, Hxt7 та Gal2 електрохімічним методом з використанням як субстрату глюкози або ксилози (Рис. 3.20).

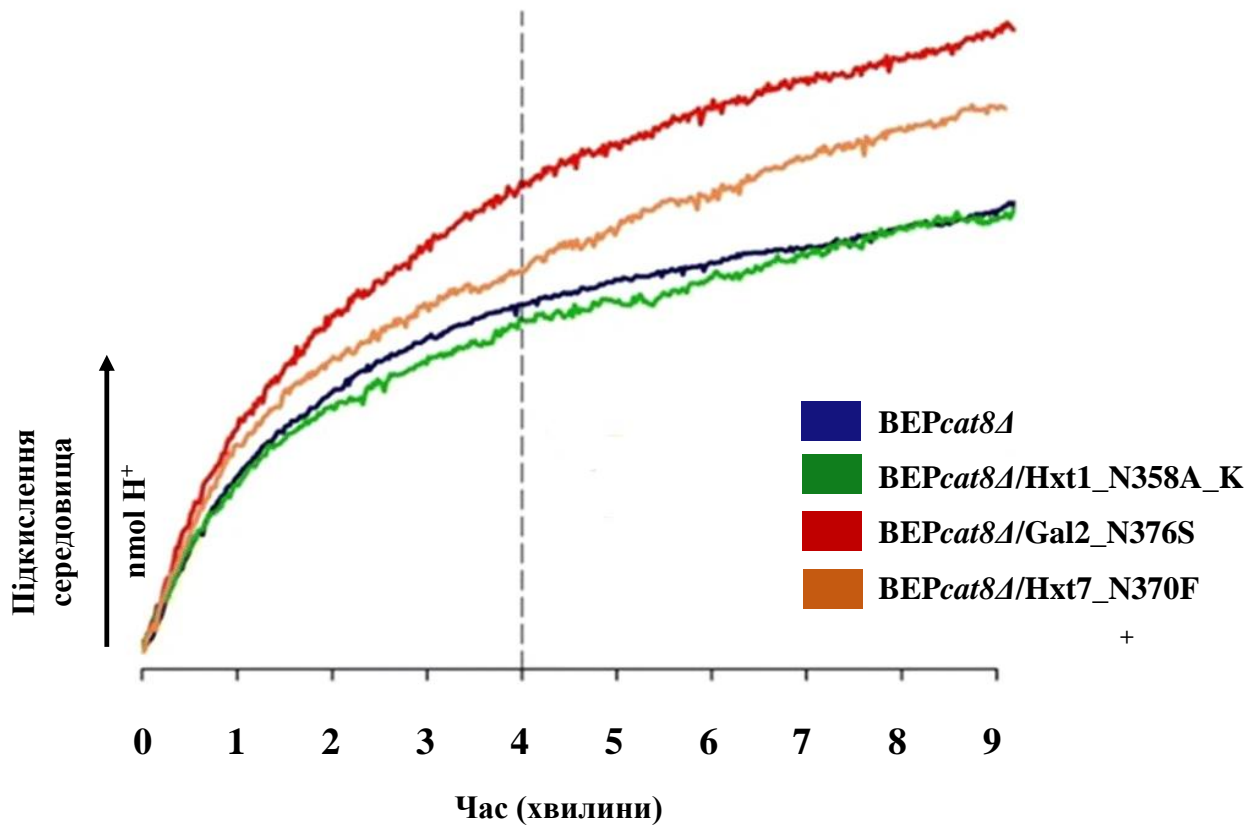


Рис. 3.20. Вплив ксилози на підкислення інкубаційного середовища клітинами *O. polymorpha*, вирощеними протягом 24 годин за умов алкогольної ферментації ксилози при 45 °С без додавання 2-дезоксиглюкози. Інкубаційне середовище містило розчинений у NaCl (95 мМ) натрій фосфат (5 мМ), рН 7,0. Стартова концентрація клітин на 0 хв становила  $6 \times 10^7$  клітин/мл. Швидкість підкислення розраховувалась протягом перших 4 хв після додавання глюкози або ксилози. Представлено усереднені результати для трьох незалежних експериментів.

Для виконання досліджень використовували клітини після 24 год культивування за умов алкогольної ферментації (140 об./хв, 45 °С) у

мінімальному середовищі з сумішшю цукрів (7% глюкоза : 3% ксилоза). Клітини осаджували, промивали водою та культивували 2 год без або з додаванням 2-дезоксиглюкози (2-DOG). DOG є аналогом глюкози, в якому гідроксильна група у другому положенні замінена на Гідроген. Під час гліколізу 2-DOG фосфорилується та перетворюється на 2-DOG фосфат, який не метаболізується у гліколітичному шляху, а накопичується в клітині та призводить до інгібування гліколізу [192]. Визначення здатності клітин закиснювати позаклітинне середовище проводили при 45 °C за допомогою рН електроду (Hanna Instruments HI1131), використовуючи суспензію клітин ( $OD_{600} = 2/\text{мл}$ ) у 0,1 М Na-P буфері рН 7.3 при постійному перемішуванні. Після реєстрації безсубстратної активності до суспензії клітин додавали відповідний вуглецевий субстрат (глюкоза, ксилоза) до кінцевої концентрації 2%. Реакцію зупиняли додаванням розчину КОН кінцевої концентрації 1мкМ. Гліколітичну активність вважали прямо пропорційною до концентрації утворених іонів  $H^+$ . Отримані результати зміни  $H^+$  у досліджуваних зразках обраховували, використовуючи програмне забезпечення NT-MDT Nova 850 та програму LabChart.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що клітини штаму з посиленою експресією модифікованого транспортера Hxt1, вирощені в середовищі з ксилозою, характеризувалися підвищеною закислювальною активністю під час додавання ксилози як субстрату порівняно із вихідним штамом, натомість, під час додавання глюкози суттєвих відмінностей між штамами не спостерігалось. Під час додавання ксилози до клітин, вирощених на суміші глюкози та ксилози, підвищена активність спостерігалася у штамів з посиленою експресією модифікованого транспортера Hxt1 (Рис. 3.20, Табл. 3.2).

У результаті виконаної роботи показано, що експресія модифікованого ендогенного транспортера Hxt1 в *O. polymorpha* має найбільш виражений позитивний вплив на одночасне споживання цукрів та продукцію етанолу під час

ко-ферментації глюкози та ксилози порівняно з експресією гетерологічних транспортерів Gal2 або Hxt7 *S. cerevisiae*.

Таблиця 3.2

**Закислення інкубаційного середовища (нмоль Н<sup>+</sup>/хв) після додавання глюкози (гл.) або ксилози (кс.) як субстратів**

Умови	Штами			
	ВЕР/ <i>cat8Δ</i>	ВЕР <i>cat8Δ</i> / Hxt1_N358A_K	ВЕР <i>cat8Δ</i> / Gal2_N376S	ВЕР <i>cat8Δ</i> / Hxt7_N370F
Клітини вирощені на суміші гл. та кс. + гл.	0,92±0,06	1,00±0,13	1,10±0,14	0,82±0,09
Клітини вирощені на суміші гл. та кс. + кс.	0,60±0,13	0,75±0,09	0,63±0,09	0,64±0,06
Клітини вирощені на кс. + кс.	0,50±0,07	0,66±0,03	0,48±0,09	0,54±0,12

Результати досліджень, описані в розділі 3.1, опубліковані в науковій праці [11].

**3.2. Дослідження ролі пероксисомних ферментів в метаболізмі та алкогольної ферментації ксилози у дріжджів *O. polymorpha***

Нещодавно було з'ясовано, що порушення біогенезу пероксисом у дріжджів *O. polymorpha*, призводить до зниження росту та ефективності алкогольної ферментації на середовищі з ксилозою як джерелі Карбону [12]. Серед ферментів асоційованих з цими органелами, було обрано для дослідження дигідроксиацетонсинтазу або пероксисомну транскетолазу (ДАС, кодується геном *DAS1*), що залучена в метаболізм метанолу та виявлений в базі даних

*O. polymorpha*, гомолог гена *TAL1* *S. cerevisiae*, який відповідає за пероксисомну трансальдолазу (кодується геном *TAL2*). Роль ДАС в алкогольній ферментації ксилози може бути обумовлена класичною транскетолазною активністю, що каталізує перетворення ксилулозо-5-фосфату в неокисній частині пентозофосфатного шляху (ПФШ).

В геномі штаму дикого типу *O. polymorpha*, був виявлений гомолог гена *TAL1*, що кодує цитозольну ТАЛ, який отримав назва *TAL2* (<http://genome.jgi.doe.gov/Hanpo2/Hanpo2.home.html>). Більшість білків, що локалізуються в пероксисомах містять сигнальну послідовність PTS1 на С-кінці білка. Завдяки наявності послідовності PTS1 було з'ясовано, що дигідроксиацетонсинтаза (*Das1*) та трансальдолази (*Tal2*) *O. polymorpha* локалізуються в пероксисомах неметилотрофних дріжджів *S. cerevisiae* [112, 119].

### **3.2.1. Посилення експресії генів, що кодують пероксисомні ферменти транскетолазу *Das1* та трансальдолазу *Tal2* у найкращого з отриманих рекомбінантних штамів *O. polymorpha* з підвищеним рівнем продукції етанолу**

З попередніх досліджень відомо, що делеційні штами *das1*Δ та *tal2*Δ демонструють значне зниження продукції етанолу з ксилози, хоча здатні нормально рости на ксилосі як джерелі Карбону. Крім того, посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* у штаму дикого типу *O. polymorpha* обумовлювало підвищення продукції етанолу з ксилози у 2,3 та 1,9 рази, відповідно [12].

Для подальшого підвищення ефективності алкогольної ферментації ксилози було посилено експресію відповідних генів у геномі попередньо отриманого штаму *O. polymorpha* – 2EthOH-/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8*Δ [5]. Цей штам є найкращим із наявних на сьогодні продуцентів етанолу з ксилози дріжджів *O. polymorpha*, одержаний методами метаболічної інженерії і класичної

селекції за рахунок надекспресії модифікованого гена *XYL1* та нативних генів *XYL2* і *XYL3*, що кодують ферменти початкових реакцій катаболізму ксилози [110], та містять делецію гена *CAT8*, що кодує транскрипційний фактор [5], був здатний продукувати до 12,5 г/л етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації при 45 °С. Це в 20 разів перевищує продукцію етанолу штамом дикого типу, але все ж поступається рекомбінантним штамам *S. cerevisiae* та *S. stipitis*, які, однак, є мезофільними мікроорганізмами.

З цією метою було здійснено конструювання плазмиди, що містить касети експресії для генів *DAS1* та *TAL2*. За допомогою ПЛР та пари праймерів Ко277/Ко280 з плазмиди рGLG61/*DAS1* було ампліфіковано касету експресії, що містить ORF гена *DAS1* під контролем сильного конститутивного промотора гена *GAP1*. Отриманий фрагмент (2,9 т.п.н.) після обробки ендонуклеазою рестрикції *Bam*HI було клоновано у *Bam*HI-лінеаризований та дефосфорильований вектор рUC57. Сконструйована плазміда отримала назву рUC57/*DAS1*. На наступному етапі касету експресії для гена *TAL2*, що містить відповідний ORF під контролем промотора *GAP1* було ампліфіковано з плазмиди рGLG61/*TAL2* за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ко405/Ко413. Отриманий фрагмент (1,8 т.п.н.) було оброблено ендонуклеазами рестрикції *Bam*HI та *Pst*I і клоновано у *Bam*HI/*Pst*I-лінеаризований вектор рUC57/*DAS1*. В результаті було отримано плазмиду рUC57/*DAS1/TAL2*. Ген *natNT2*, що забезпечує резистентність бактерійних та дріжджових трансформантів до антибіотика норзеотрицину, було ампліфіковано з плазмиди рRS41N [179] за допомогою ПЛР та пари праймерів ОК42/ОК43. Отриманий фрагмент розміром 1,3 т.п.н. після обробки ендонуклеазою рестрикції *Nde*I було клоновано у *Nde*I-лінеаризовану та дефосфорильовану плазмиду рUC57/*DAS1/TAL2*. В результаті було отримано плазмиду рUC57/*DAS1/TAL2/NTC* (Рис. 3.21), яку було використано для посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* в рекомбінантному штамі *O. polymorpha*

2EthOH<sup>-</sup>/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8*Δ, отриманому методами метаболічної інженерії та класичної селекції. Вектор pUC57/DAS1/TAL2/NTC було введено в штам *O. polymorpha* методом електропорації.

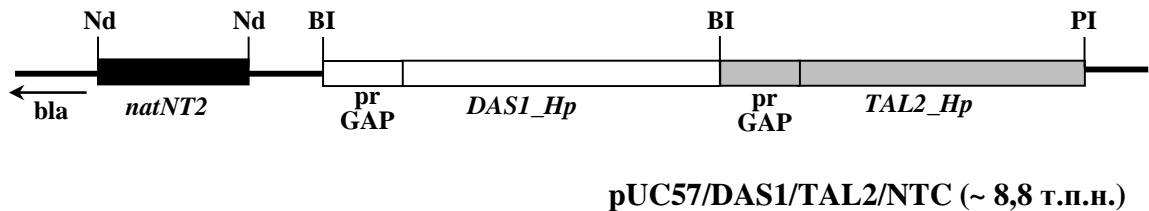


Рис. 3.21. Лінійна схема плазміди pUC57/DAS1/TAL2/NTC для посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* *O. polymorpha*. *natNT2* – маркерний ген, що забезпечує резистентність до норзеотрицину; prGAP – промотор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; бактерійна частина, що несе ген резистентності до ампіциліну (*bla*), позначена тонкою чорною смугою. Скорочення сайтів рестрикції: Nd, NdeI; BI, BamHI; PI, PstI [12].

Трансформанти відбирали на багатому поживному середовищі YPD з додаванням норзеотрицину (100 мг/л). На третю добу культивування було відібрано низку трансформантів.

Для отримання стабільних рекомбінантних штамів трансформанти культивували в неселективних умовах з подальшим відбором клонів, які зберігали здатність рости на середовищі з антибіотиком. В отриманих стабільних трансформантів інтеграція плазміди в геном була підтверджена методом ПЛР, використовуючи праймери Ko277/Ko280 та Ko405/Ko413 для касет експресії генів *DAS1* та *TAL2*, відповідно.



За допомогою ПЛР у реальному часі було підтверджено підвищення рівня експресії генів *DAS1* та *TAL2* в отриманих рекомбінантних штаммах у порівнянні із штамом дикого типу (Рис. 3.22).

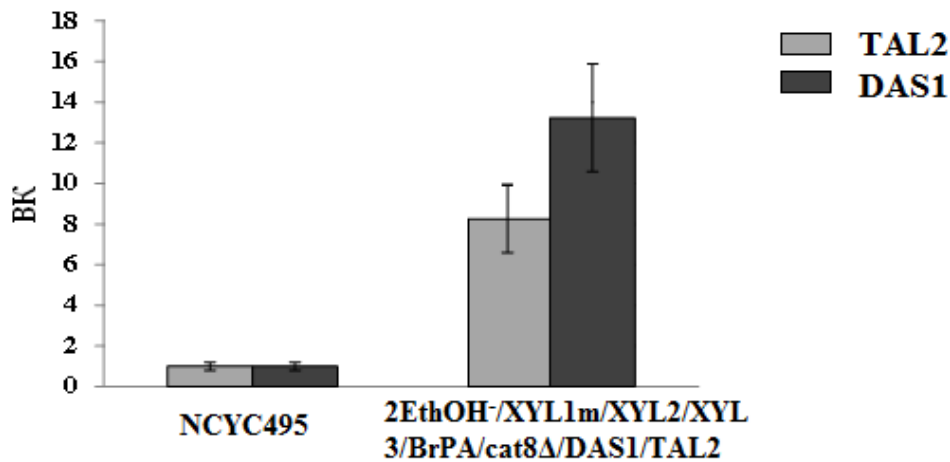


Рис. 3.22. ПЛР у реальному часі генів *DAS1* та *TAL2* штамів *O. polymorpha* NCYC495 (WT) та 2EthOH-/XYL1m-/XYL2-/XYL3-/BrPA-/cat8Δ-/DAS1-/TAL2 при культивуванні у середовищі з ксилозою в умовах обмеженої аерації при 45 °С. Праймери для гена *ACT1*, що кодує актин, були використані як контроль. BK – відносна кількість.

У сконструйованих рекомбінантних штамів спостерігалось підвищення рівня експресії генів *DAS1* та *TAL2* в умовах ферментації ксилози у 8 та 13 разів, відповідно, порівняно із штамом дикого типу.

### **3.2.2. Характеристика алкогольної ферментації отриманих рекомбінантних штамів дріжджів *O. polymorpha* з посиленою експресією генів *DAS1* та *TAL2***

Стабільні рекомбінантні штами з посиленою експресією генів *DAS1* та *TAL2* були використані для дослідження здатності продукувати етанол під час

культивування за умов обмеженої аерації в рідкому мінімальному середовищі з 10% ксилозою при 45 °С.

Посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* в геномі штаму 2EthOH<sup>-</sup>/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8Δ* обумовлювало підвищення продукції етанолу з ксилози на 29%. (Рис. 3.23). У штаму ВЕР*cat8Δ/DAS1/TAL2* продукція етанолу зростає до 16 г/л у той час як вихідний штам накопичував близько 12,5 г/л, а вихід етанолу становив 0,39 г/г ксилози (Табл. 3.3), що є найкращим результатом серед усіх рекомбінантних штамів *O. polymorpha*.

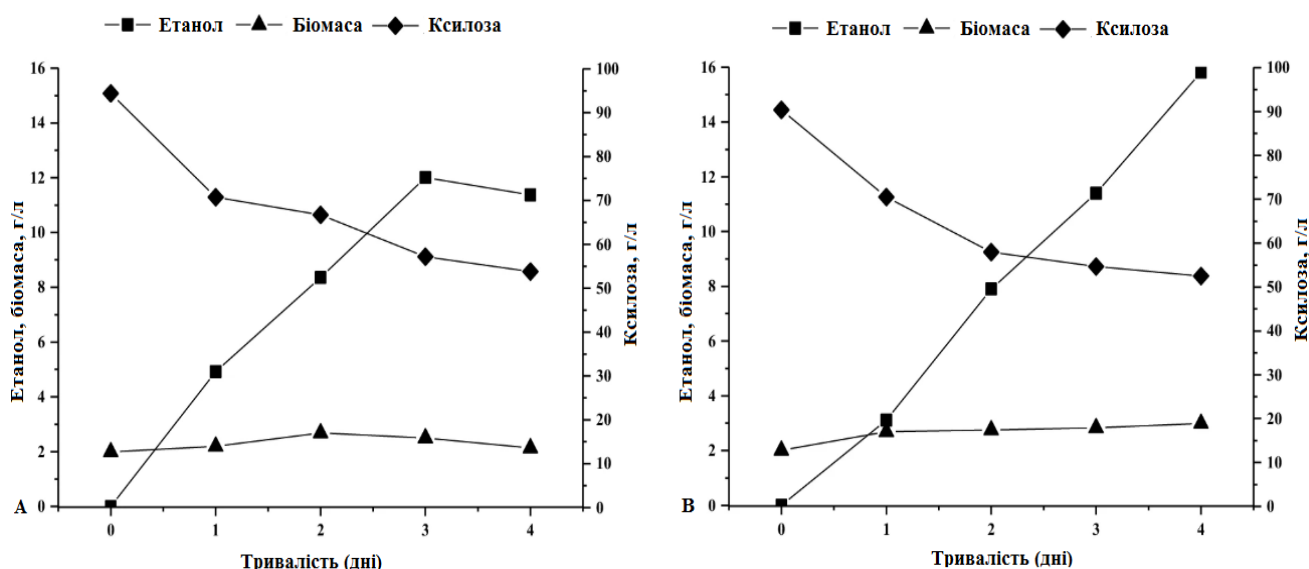


Рис. 3.23. Продукція етанолу, накопичення біомаси та споживання ксилози під час спиртового бродіння ксилози при 45 °С штамами *O. polymorpha* ВЕР*cat8Δ* (А) та ВЕР*cat8Δ/DAS1/TAL2* (Б) [12].

Крім цього, під час бродіння штам ВЕР*cat8Δ/DAS1/TAL2* акумулював лише слідові кількості ксиліту (до 0,5 г/л) [12]. Втім, штами з ко-експресією *DAS1* та *TAL2* не характеризувались покращеним споживанням ксилози з середовища в порівнянні із батьківським штамом (Рис. 3.23). Отримані трансформанти не

демонстрували змін у продукції етанолу у середовищі з глюкозою, що свідчить про незалежність зброджування глюкози від пероксисомних транкетоксилази та трансальдолази.

Таблиця 3.3

**Продуктивність і вихід етанолу у рекомбінантних штамів *O. polymorpha* порівняно із реципієнтним штамом ВЕР/*cat8Δ* під час ферментації ксилози при 45 °С**

Штами	Етанол, г/л	Вихід етанолу, г/г спожитої ксилози	Швидкість продукції етанолу, г/г біомаси/год	Продуктивність утворення етанолу, г/л/год
<b>ВЕР/<i>cat8Δ</i></b>	12.510±0,134	0,340±0,015	0,091±0,003	0,205±0,009
<b>ВЕР<i>cat8Δ/DAS1/TAL2</i></b>	16.132±0,141	0,393±0,017	0,092±0,004	0,210±0,005

Отже, надекспресія пероксисомних ферментів дигідроксиацетонсинтази та трансальдолази призводить до покращення здатності перетворювати ксилозу до етанолу у метилотрофних термотолерантних дріжджів *O. polymorpha*, однак механізм дії пероксисомних ферментів на алкогольну ферментацію ксилози залишається невідомим і потребує подальшого дослідження. У результаті проведених досліджень, було отримано штам *O. polymorpha*, що здатні продукувати більше 16 г/л етанолу з ксилози, що в 40 разів перевищує продуктивність штаму дикого типу, який утворює до 0,5 г/л етанолу під час алкогольної ферментації при підвищеній температурі.

Результати досліджень, описані в розділі 3.2, опубліковані в науковій праці [12].

### 3.3. Конструювання штамів дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону

Синтез *in vivo* різними мікроорганізмами з подальшою екстракцією та очищенням продукту в даний час є найбільш поширеним методом комерційного виробництва глутатіону [133].

Термотолерантні метилотрофні дріжджі *O. polymorpha* вважаються перспективними продуцентами глутатіону, оскільки цей вид дріжджів відрізняється високою стійкістю до різних стресових умов, викликаних важкими металами, ксенобіотиками та різними забруднювачами. Завдяки участі GSH в детоксикації проміжних продуктів метаболізму метанолу, формальдегіду, а також перекису водню та алкільних гідропероксидів, що утворюються під час росту, метилотрофні дріжджі *O. polymorpha* здатні захищати свої клітини від оксидативного стресу, теплового та осмотичного шоку [137].

Механізми регуляції біосинтезу глутатіону у метилотрофних дріжджів (зокрема у *O. polymorpha*) та забезпечення гомеостазу цього трипептиду у клітині залишаються в багатьох аспектах недостатньо дослідженими. Існують докази того, що рівень GSH в клітині залежить від природи джерел Карбону та Нітрогену. У процесі культивування на середовищі з глюкозою клітини дріжджів *S. cerevisiae* накопичували значно вищу концентрацію GSH ніж під час росту на етанолі. Азотне голодування також стимулювало синтез GSH *de novo*, оскільки, промотори обох генів *GSH1* та *GSH2* містять ділянки, які відповідають за надпродукцію GSH у разі дефіциту Нітрогену [160]. GSH необхідний для депонування Сульфуру, а його внутрішньоклітинна концентрація знижується за умов його дефіциту [161, 162]. Сульфат необхідний для біосинтезу цистеїну, який, у свою чергу, є одним із трьох компонентів GSH [161]. Додавання амінокислот-попередників, зокрема цистеїну, до культуральних середовищ, на

сьогоднішній день використовується для регулювання продукції глутатіону [133, 162].

Одним з основних недоліків використання дріжджів є строго контрольований синтез глутатіону та обмеження надмірного його накопичення в клітині. Підвищення вмісту внутрішньоклітинного глутатіону може бути досягнуто за допомогою еволюційної або метаболічної інженерії.

Проте, було встановлено, що посилення експресії як гена *GSH2*, що кодує  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетазу, так і *MET4*, що кодує транскрипційний активатор генів біосинтезу цистеїну (попередник синтезу глутатіону), підвищує вміст внутрішньоклітинного глутатіону у метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* [14], [168]. Хоча у *S. cerevisiae* біосинтез GSH регулюється кооперативною дією Yap1 та Met4, дослідження участі цих факторів в регуляції синтезу GSH у *O. polymorpha* показали, що у цих дріжджів Met4 за умов дефіциту сірки та впливу іонів кадмію безпосередньо не впливає на *HpGSH2* ген. Також було показано, що такі сірковмісні сполуки, як GSH, цистеїн, метіонін та дитіотреїтол, незначно впливають на експресію *GSH2* гена у *O. polymorpha* [144].

У даній роботі було здійснено ко-експресію гена *MET4* в попередньо отриманому штамі з посиленою експресією гена *GSH2* (*mc GSH2*) з метою подальшого підвищення вмісту глутатіону в клітинах дріжджів *O. polymorpha*.

### **3.3.1. Отримання штамів дріжджів *O. polymorpha* з посиленою експресією гена транскрипційного активатора Met4.**

Для отримання рекомбінантних штамів дріжджів *O. polymorpha* з посиленою експресією транскрипційного активатора Met4 було сконструйовано плазмиду pUC19/prGAP\_MET4/NTC (Рис. 3.24) [16, 17, 18].

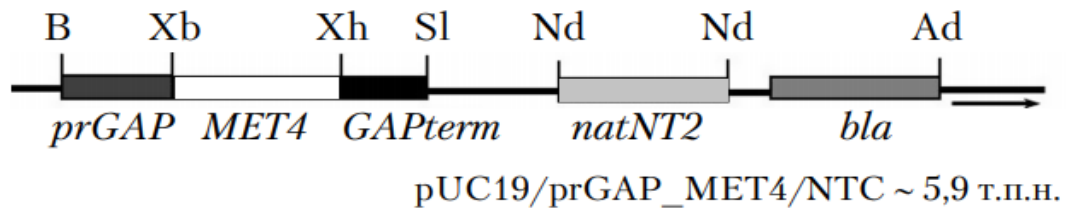


Рис. 3.24. Лінійна схема плазміди pUC19/prGAP\_MET4/ NTC: *prGAP* — промотор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; *GAPterm* — термінатор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; *natNT2* — ген стійкості до норзеотрицину; *MET4* — ген, що кодує транскрипційний фактор, залучений у біосинтез цистеїну. Скорочення сайтів рестрикції: B, BamHI; Xb, XbaI; Xh, XhoI; Sl, SalI; Nd, NdeI; Ad, AdhI [17, 18].

Послідовність гена *MET4 O. polymorpha* була отримана з бази даних цього виду дріжджів (<http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>). За допомогою ПЛР з геномної ДНК *O. polymorpha* було ампліфіковано ген *MET4*. Нативний промотор даного гена був заміщений сильним конститутивним промотором гена *GAP1 O. polymorpha*, що кодує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу. На першому етапі промотор та термінатор гена *GAP1* були ампліфіковані з геномної ДНК *O. polymorpha* за допомогою ПЛР, використовуючи відповідні пари праймерів Ко644/Ко645 та Ко646/Ко647. Отримані фрагменти були з'єднані за допомогою ПЛР з використанням праймерів Ко644 та Ко647. Ампліфікований фрагмент розміром 0,8 т.п.н. було оброблено ендонуклеазами рестрикції BamHI та SalI. В результаті сконструйована плазміда отримала назву pUC19/ prGAP. На наступному етапі ген стійкості до норзеотрицину *natNT2* було ампліфіковано з плазміди pRS41N [179] за допомогою ПЛР, використовуючи праймери ОК42/ОК43. Отриманий фрагмент розміром 1,3 т.п.н. було оброблено ендонуклеазою рестрикції NdeI і клоновано у NdeI-лінеаризовану плазмиду pUC19/GAP. В результаті

сконструйована плазмідна отримала назву pUC19/prGAP/NTC. Ген *MET4* було ампліфіковано з геномної ДНК *O. polymorpha* за допомогою ПЛР, використовуючи праймери Ko655 та Ko677 і клоновано у XbaI/NotI-лінеаризований вектор pUC19/prGAP/NTC. Сконструйована плазмідна отримала назву pUC19/prGAP\_MET4/NTC (Рис. 3.24).

Сконструйовану плазмідну pUC19/prGAP\_MET4/NTC було використано для посилення експресії гена *MET4* в найкращому з наявних рекомбінантних штамів *O. polymorpha*, здатних до надсинтезу глутатіону. Як вихідний було використано рекомбінантний штам з посиленою експресією гена *GSH2* *O. polymorpha* під контролем нативного промотора у складі плазміді для мультикопійної інтеграції, що характеризувався підвищеним рівнем синтезу глутатіону на середовищі з глюкозою порівняно із штамом дикого типу [14]. Вектор pUC19/prGAP\_MET4/NTC було введено в обраний штам *O. polymorpha* методом електропорації [184].

Селекцію трансформантів проводили на багатому поживному середовищі YPD з додаванням норзеотрицину (100 мг/л). Для отримання стабільних рекомбінантних штамів трансформанти культивували в неселективних умовах з подальшим відбором клонів, які зберігали здатність рости на середовищі з антибіотиком. В отриманих стабільних трансформантів інтеграція плазміді у геном була підтверджена методом ПЛР з використанням відповідної пари праймерів Ko644 (специфічний для промотора *GAP1*) та Ko677 (специфічний для гена *MET4*).

За допомогою ПЛР у реальному часі (qRT-PCR) було встановлено, що рівень експресії гена *MET4* був більш ніж у 200 разів вищим у штамі *mcGSH2/MET4(pGAP)* з посиленою експресією генів *GSH2* та *MET4* порівняно із батьківським штамом з надекспресією гена *GSH2* (*mcGSH2*).

### 3.3.2. Дослідження продукції глутатіону отриманими рекомбінантними штамами дріжджів *O. polymorpha*

Для дослідження вмісту внутрішньоклітинного глутатіону отримані рекомбінантні штами дріжджів вирощували в аеробних умовах в колбах об'ємом 100 мл, що містили 30 мл середовища YNB при 37 °С. Умов аерації досягали перемішуванням зі швидкістю 220 об./хв. Вихідна оптична густина клітин, інокульованих у середовище, становила  $OD_{590} = 0,1$ . Культивування проводили протягом 5 днів, зразки для визначення глутатіону відбирали кожної доби.

В результаті посилення експресії генів *GSH2* та *MET4* спостерігалось значне підвищення рівня глутатіону під час культивуванні у середовищі YNB (Рис. 3.25).

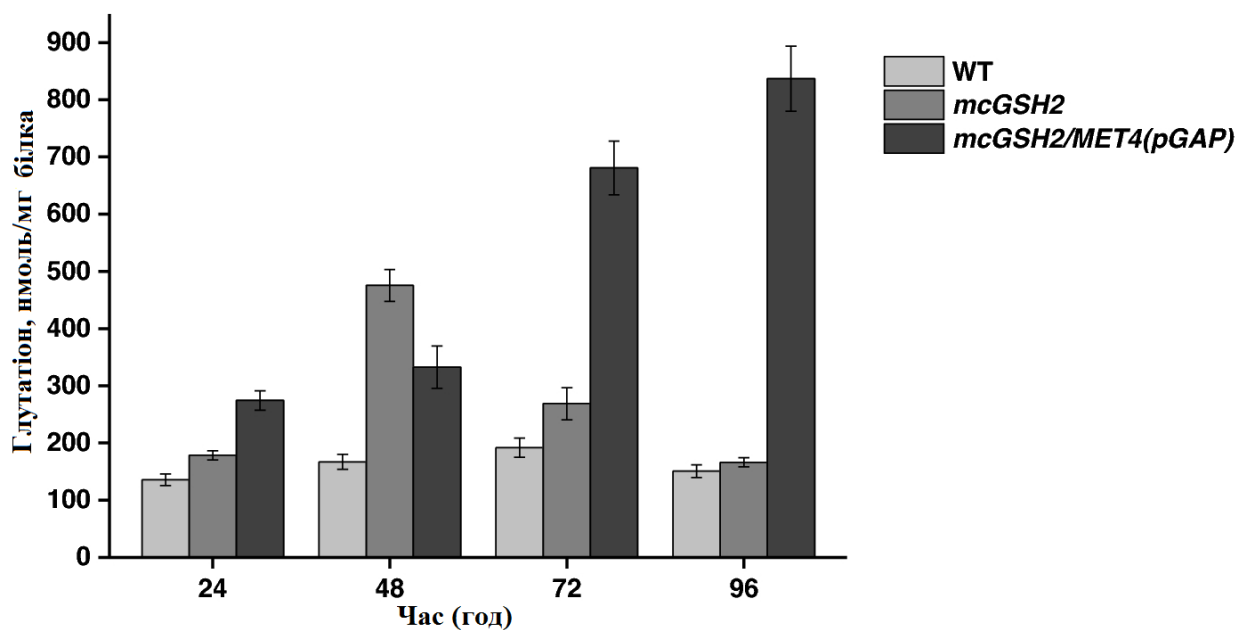


Рис. 3.25. Вміст внутрішньоклітинного глутатіону у рекомбінантних штамах *O. polymorpha* із посиленою експресією генів *MET4* та *GSH2* (*mcGSH2/MET4(pGAP)*) порівняно з батьківським штамом (*mcGSH2*) під час



культивування у середовищі YNB із глюкозою як джерелом Карбону в аеробних умовах при 37 °C [18].

Крім цього, встановлено, що динаміка накопичення глутатіону в штамі дикого типу (WT) та рекомбінантних штаммах *mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* значно відрізняється. Максимальний вміст глутатіону в клітинах *mcGSH2/MET4(pGAP)* спостерігався через 96 год, проте на 48 год продукція глутатіону штамом *mcGSH2* перевищувала штам *mcGSH2/MET4(pGAP)* (Рис. 3.25, Табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Продукція глутатіону штамми *O. polymorpha* (WT, *mcGSH2* та *mcGSH2/MET4 (pGAP)*) під час культивування у середовищі YNB за аеробних умов при 37 °C**

Штами	GSH, нмоль/мг білка	GSH, мг/л (мкмоль/л)	GSH, мг/г сухої біомаси клітин
WT <sup>a</sup>	191,9±19,2	418,1±37,6 (1393,00±125,37)	39±3,9
mcGSH <sup>b</sup>	475,5±038	1223,0±61,1 (4076,7±203,8)	85±6,6
mcGSH/MET4 (pGAP) <sup>c</sup>	837,0±58,5	2167±65,3 (7223,3±216,7)	134,0±9,4

a – 72 год культивування;

b – 48 год культивування;

c – 96 год культивування.

Ймовірно, така динаміка синтезу глутатіону є наслідком впливу фактора транскрипції Met4 на реакції, які беруть участь у синтезі цистеїну, що є попередником глутатіону. Одним з можливих пояснень також може бути зміщення балансу між реакціями, що беруть участь у синтезі та деградації глутатіону в отриманих рекомбінантних штаммах.

Вміст глутатіону в клітинах штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* сягав 837 нмоль/мг білка, що у 1,8 та 4,4 раза вище, ніж у штамів *mcGSH2* та WT, відповідно. Максимальна внутрішньоклітинна продукція глутатіону штамом *mcGSH2/MET4(pGAP)* становила 2167 мг/л, що у 5 і 1,8 раза більше порівняно з WT та *mcGSH2*. В перерахунку на суху біомасу вміст глутатіону в штамі *mcGSH2/MET4 (pGAP)* становив 134 мг/г сухої біомаси клітин (Табл. 3.4).

Крім того, встановлено, що *mcGSH2/MET4(pGAP)* здатен продукувати в 2 рази більше позаклітинного глутатіону на п'ятий день культивування порівняно зі штамом дикого типу, досягаючи 187 мкмоль/л (Рис. 3.26).

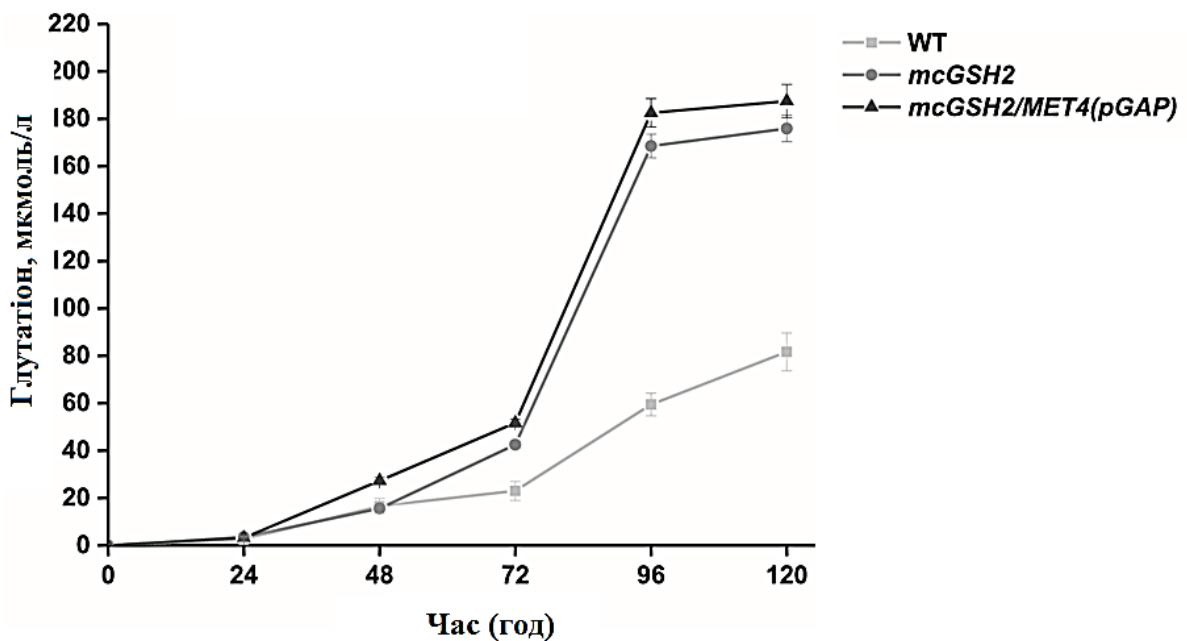


Рис. 3.26. Вміст позаклітинного глутатіону під час культивування штамів

*O. polymorpha* (WT, *mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)*) на середовищі YNB в аеробних умовах при 37 °С [18].

На наступному етапі дослідження рекомбінантні штами *mcGSH2/MET4(pGAP)* та *mcGSH2* були перевірені на здатність продукувати глутатіон у напівпромислових (пілотних) умовах культивування (Рис. 3.27).

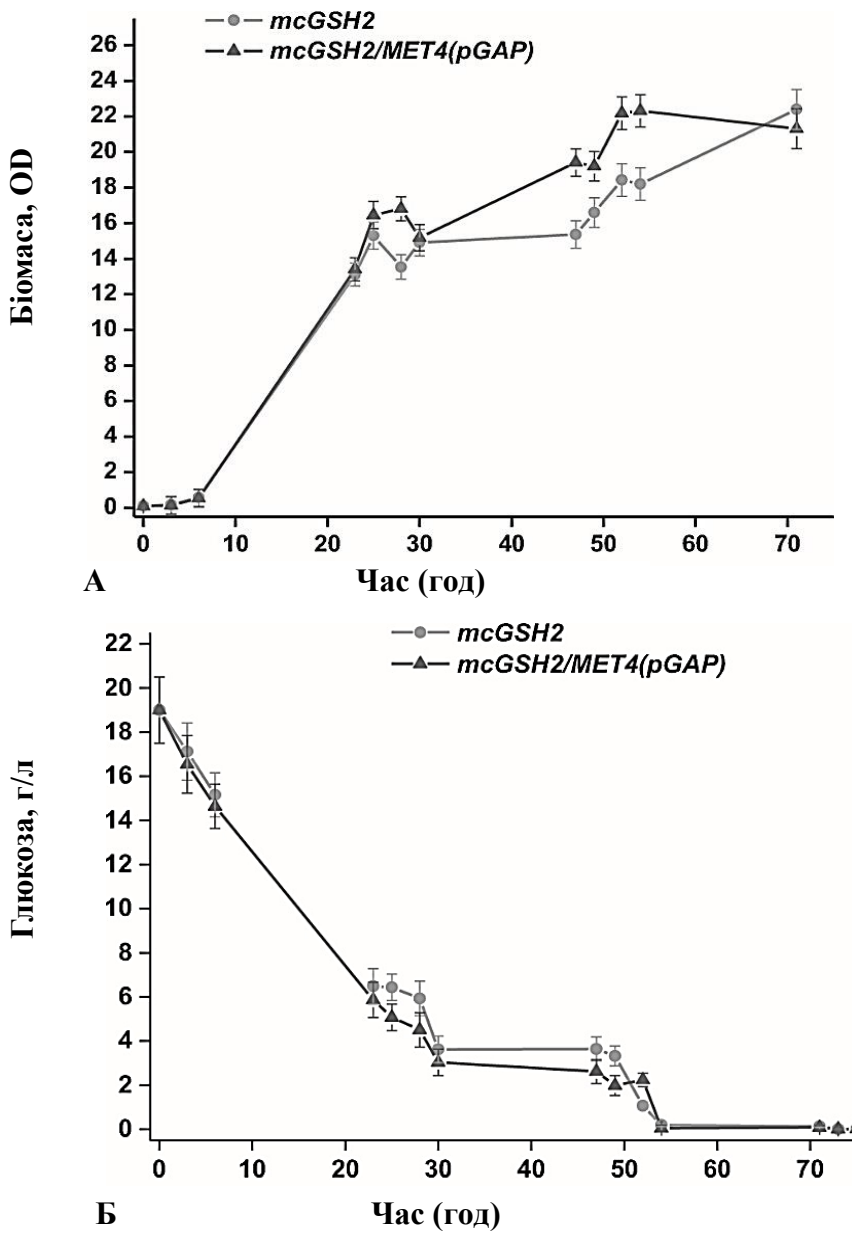


Рис. 3.27. Нагромадження біомаси (А) та споживання глюкози (Б) під час

культивуванні рекомбінантних штамів *O. polymorpha mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* в біореакторах при 37 °С [14].

Аналіз приросту біомаси та вмісту глутатіону здійснювали у 2 л ферментері В-Twin Biostat (Sartorius), що містив 1 л середовища при 37 °С без контролю рН. Швидкість перемішувача автоматично регулювалася в межах 140–1000 об/хв, щоб підтримувати значення насиченості киснем у межах 30%.

Вихідна оптична густина клітин, інокульованих у середовище в біореакторі, становила 1 ( $OD_{600}$ ). Культивування проводилося на мінеральному середовищі:  $(NH_4)_2SO_4$  – 5 г/л,  $KH_2PO_4$  – 3 г/л,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,5 г/л, глюкоза - 20 г/л; розчин мікроелементів  $\times 100$ : ЕДТА - 15 мг;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  - 4,5 мг;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  - 0,3 мг;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  - 1 мг,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  - 4,5 мг;  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  - 0,4 мг;  $H_3BO_3$  - 1 мг;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  - 4,5 мг;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  - 3 мг; KI - 0,1 мг; розчин вітамінів  $\times 1000$ : біотин - 0,5 мг; пантотенат кальцію - 10 мг; нікотинова кислота - 10 мг; інозитол - 250 мг; тіамін - 10 мг; піридоксин - 10 мг. Протягом культивування проводився мікроскопічний та мікробіологічний контроль чистоти культури, температури, вмісту цукру у середовищі, приросту біомаси та вмісту цільового продукту. Тривалість ферментації становила 71 год.

Під час культивування у біореакторах ріст обидвох штамів та швидкість споживання глюкози обома штамами суттєво не відрізнялися (рис. 3.27 А, Б).

Вміст внутрішньоклітинного глутатіону штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* в 5 разів перевищував вміст глутатіону в клітинах штаму *mcGSH2* на 25 год культивування, досягаючи 249 нмоль/мг білка. Також протягом 71 год культивування вміст глутатіону в клітинах штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* був суттєво вищим порівняно із штамом *mcGSH2*. Проте, на 71 год обидва штами нагромаджували глутатіону 420 нмоль /мг білка, що є нижчим значенням порівняно із культивуванням в лабораторних умовах (Рис. 3.28).

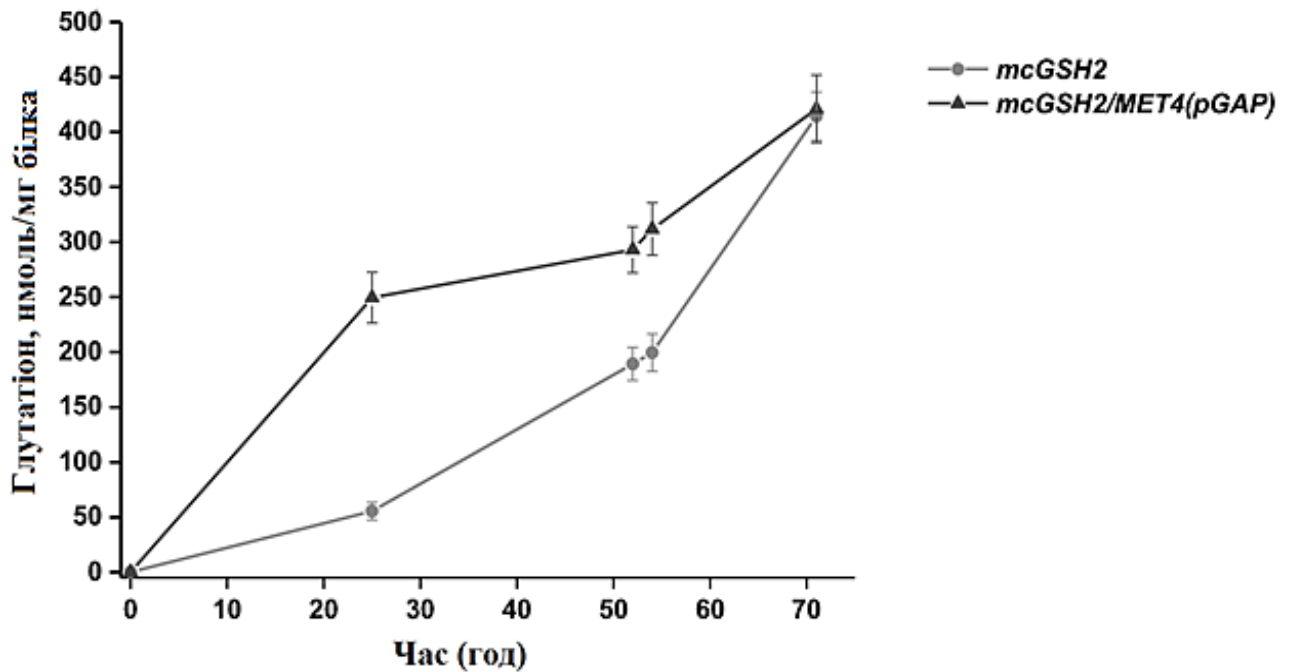


Рис. 3.28. Вміст внутрішньоклітинного глутатіону рекомбінантних штамів *O. polymorpha mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* під час культивування в біореакторі при 37 °С.

Таку відмінність можна пояснити складом мінерального середовища, що використовується під час культивування у біореакторі, порівняно з YNB, яке використовували в лабораторних умовах. Однак, вміст глутатіону протягом перших 24 год культивування був значно вищим для штаму *mcGSH2/MET4 (pGAP)* порівняно з батьківським штамом (249 та 55 нмоль/мг білка відповідно), тоді як вміст глутатіону для штаму *mcGSH2/MET4 (pGAP)* порівняно з вихідним штамом в колбах, був незначно покращений (179 та 274 нмоль/мг білка, відповідно).

Отож, рекомбінантні штами *O. polymorpha* з ко-експресією генів *GSH2* та *MET4* характеризуються суттєво підвищеною продукцією глутатіону порівняно зі штамом дикого типу *O. polymorpha DL-1* за лабораторних умов культивування. В результаті проведених досліджень отримано штам *O. polymorpha*

*mcGSH2/MET4(pGAP)*, який характеризується одним з найкращих показників продукції глутатіону в порівнянні з іншими дріжджовими продуцентами цього трипептиду, які на сьогодні відомі.

### **3.3.3. Дослідження ролі глутатіону в алкогольній ферментації у дріжджів *O. polymorpha***

Хоча адаптація технологічних напрямків для детоксикації гідролізатів інтенсивно вивчається, необхідні додаткові процеси, що не призводять до втрати цукрів і вартість яких залишиться доступною. Тому толерантність дріжджів до хімічного середовища є одним із ключових критеріїв ефективною попередньої обробки і спиртового бродіння в цілому.

Глутатіон є однією з основних сполук, що беруть участь в захисті клітин від численних стресових чинників, однак його роль в захисті клітин дріжджів від етанольного стресу, а також вплив на продукцію етанолу під час зброджування глюкози і ксилози у дріжджів *O. polymorpha* дотепер залишалися не з'ясованими.

Показано, що високий вміст внутрішньоклітинного GSH, досягнений за рахунок метаболічної інженерії, мав позитивний вплив на продукцію етанолу з глюкози термотолерантними дріжджами *O. polymorpha*, натомість для дріжджів *S. cerevisiae* такої кореляції не спостерігалось [168]. Було висловлено кілька гіпотез можливої ролі глутатіону в умовах спиртового бродіння глюкози, втім, його можливий вплив на алкогольну ферментацію ксилози дотепер залишався недослідженим.

Для дослідження впливу вмісту внутрішньоклітинного глутатіону на ефективність алкогольної ферментації було використано ряд штамів *O. polymorpha*: штами з посиленою експресією гена *GSH2* (гомолог гена *GSH1* *S. cerevisiae*, що кодує  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетазу, перший фермент біосинтезу GSH) [14] та штам із ко-експресією *GSH2* та *MET4* (ген, що кодує

транскрипційний фактор залучений в регуляцію метаболізму цистеїну, який є попередником GSH). Для контролю були використані прототрофні та ауксотрофні за лейцином штами дикого типу *O. polymorpha* DL-1.

Штами *O. polymorpha mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* під час алкогольної ферментації ксилози при 45 °С характеризувалися у 3 рази підвищеною продукцією етанолу, що сягає концентрації 1 г/л, порівняно із штамом дикого типу на 2 добу культивування за умов обмеженої аерації. Підвищення продукції етанолу супроводжувалося незначним зростанням швидкості споживання ксилози (Рис. 3.29 А).

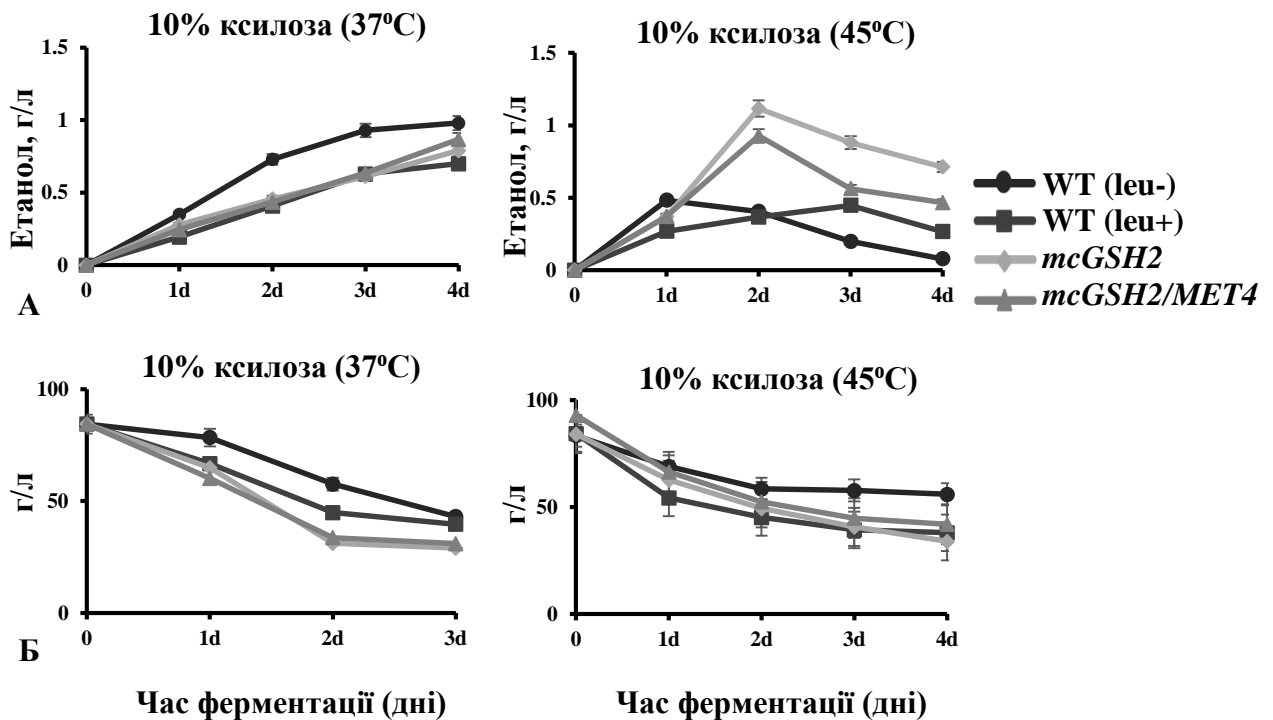


Рис. 3.29. Продукція етанолу (А) та споживання ксилози (Б) під час ферментації штамів *O. polymorpha* з посиленою експресією генів *GSH2* (*mcGSH2*) і *MET4* (*mcGSH2/MET4*).

Під час ферментації ксилози при 37 °С у штамів *mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* не спостерігалось утворення підвищеної кількості етанолу порівняно із штамом дикого типу, проте динаміка споживання ксилози була незначно покращена (Рис. 3.29 Б).

На відміну від високотемпературної алкогольної ферментації ксилози, під час ферментації глюкози у рекомбінантних штамів та штамів дикого типу не спостерігалось суттєвих відмінностей в продукції етанолу (Рис. 3.30 А) та динаміці споживання глюкози (Рис. 3.30 Б).

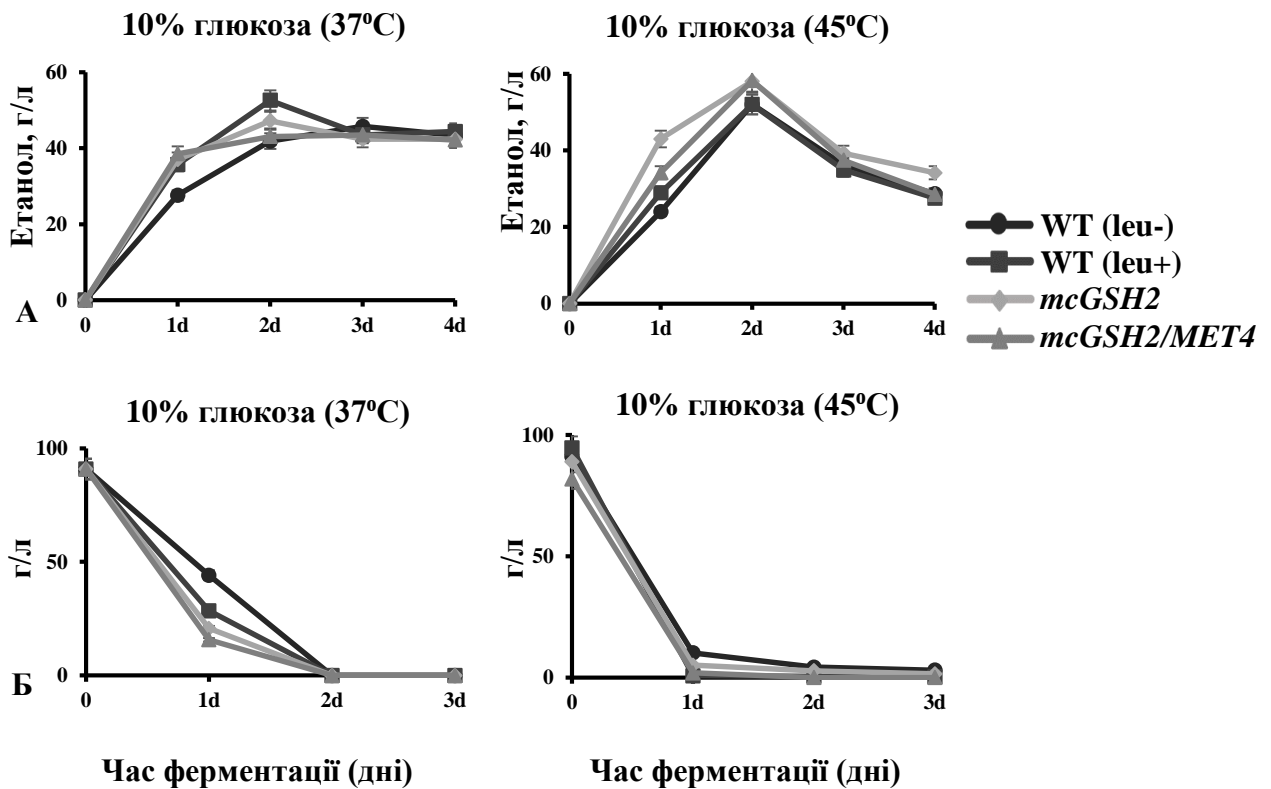


Рис. 3.30. Продукція етанолу (А) та споживання глюкози (Б) під час ферментації штамів *O. polymorpha* з посиленою експресією генів *GSH2* (*mcGSH2*) і *MET4* (*mcGSH2/MET4*).



Отже, підвищення вмісту внутрішньоклітинного глутатіону має позитивний вплив на продукцію етанолу дріжджами *O. polymorpha* під час зброджування ксилози при 45 °С на відміну від 37 °С. Отримані результати вказують на важливість глутатіону для продукції етанолу в умовах підвищеної температури як стресового чинника та наявності ксилози, що є менш ефективним для зброджування джерелом Карбону порівняно з глюкозою.

Результати досліджень, описані в розділі 3.3, опубліковані в наукових працях [16, 17, 18].

### **3.4 Підсумок**

У цій роботі використані різноманітні підходи для підвищення продукції етанолу з ксилози та вмісту внутрішньоклітинного глутатіону у метилотрофних термотолерантних дріжджів *O. polymorpha*. З метою покращення споживання ксилози в умовах алкогольної ферментації була успішно здійснена модифікація транспортерів Hxt1 *O. polymorpha*, Gal2 та Hxt7 *S. cerevisiae*. Встановлено позитивний вплив посилення експресії генів пероксисомних ферментів дигідроксиацетонсинтази та трансальдолази на продукцію етанолу під час зброджування ксилози. За рахунок посилення експресії генів *MET4* та *GSH2* було отримано штами з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону у дріжджів *O. polymorpha*, які характеризувалися підвищеною продукцією етанолу з ксилози в умовах високотемпературної алкогольної ферментації. Отримані результати мають важливе значення для з'ясування низки лімітуючих етапів шляху перетворення ксилози до етанолу у дріжджів здатних до утилізації цієї пентози та можуть слугувати базою для подальшої селекції більш ефективних продуцентів етанолу, а також розробки технології одержання цього спирту з гідролізатів рослинної біомаси.

Оскільки ефективність утилізації ксилози все ще є значно нижчою порівняно з глюкозою, необхідна ретельна оцінка балансу споживання цукрів протягом ферментації, підтримка їх оптимального надходження, а також використання комбінації різних транспортерів, які активуються за різних концентрацій цукру протягом усього бродіння. У промислових умовах стійкість штамів дріжджів до токсичних побічних продуктів у попередньо обробленій сировині та оцтової кислоти, що накопичується під час бродіння, залишається головним викликом.

Поєднання успішних підходів метаболічної інженерії є перспективним шляхом підвищення продуктивності алкогольної ферментації ксилози у цього виду дріжджів для досягнення рентабельності виробництва етанолу другого покоління із застосуванням технології SSF.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Питання важливості виробництва та споживання біологічних видів палива пов'язані з забрудненням навколишнього середовища внаслідок використання викопних енергетичних ресурсів, світові запаси яких є обмеженими. Дослідження показали, що основними чинниками, які спонукають світову спільноту до виробництва біологічного палива, є ціновий та екологічний фактори.

Для України біоенергетика є одним із стратегічних напрямків розвитку сектору відновлюваних джерел енергії, враховуючи високу залежність країни від імпортованих енергоносіїв і великий потенціал біомаси, доступної для виробництва енергії. Верховна Рада України зареєструвала законопроект, що передбачає обов'язкову норму добавки біоетанолу та біодизеля в усьє паливо, що продається в країні. За оцінками Біоенергетичної асоціації України у разі затвердження документу в державі було б створено гарантований ринок збуту для 350 тис. т етанолу на рік. Проте, проект був відкликаний. Нова енергетична стратегія України, що передбачала стимулювання заміщення нафти та природного газу альтернативними видами палива, незважаючи на певний прогрес у розвитку біоенергетичних технологій протягом минулих років, дотепер містить ряд бар'єрів і неврегульованих питань.

Найважливішою і найціннішою особливістю біопалива є відновлюваний характер сировини, з якої його отримують, а це створює можливості для аграрного сектору виступати виробником та споживачем різних типів біопалива.

Оскільки, діяльність людини завжди супроводжуватиметься утворенням відходів, створюється відмінна сировинна база для виробництва біопалива.

Одним з перспективних поновлюваних видів палива вважається біоетанол. На відміну від процесу виробництва біоетанолу з цукру і крохмалю, його виробництво з гідролізатів лігніноцелюлози базується на ферментації суміші цукрів у присутності інгібуючих сполук: органічних кислот з низькомолекулярною масою, похідних фурану і неорганічних сполук, що утворились під час попередньої обробки й гідролізу сировини. Лігніноцелюлозні матеріали, особливо тверда деревина і сільськогосподарські сировинні залишки, можуть містити до 5–30% пентозних цукрів ксилози і арабінози. Ці цукри не зброджуються до етанолу промисловими мікроорганізмами, зокрема дріжджами *S. cerevisiae*. Тому основні зусилля дослідників спрямовані на пошук ефективних мікроорганізмів, здатних до ферментації пентоз.

Перспективними дріжджами для отримання етанолу під час ферментації ксилози є *O. polymorpha*, оскільки вони здатні до алкогольної ферментації ксилози при підвищених температурах (45 - 48 °C). Така властивість перетворює цей вид дріжджів в організм здатний до здійснення ефективного процесу одночасної сахарифікації та ферментації (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF). Цей процес об'єднує ферментативний гідроліз лігноцелюлозного матеріалу (оптимальна температура дії гідролітичних ферментів целюлаз і геміцелюлаз становить близько 50 - 60°C) з наступною ферментацією вивільнених цукрів. Однак, для досягнення рентабельності цього процесу, основні параметри алкогольної ферментації ксилози дріжджами *O. polymorpha* потребують покращення.

Отже, для створення промислових продуцентів етанолу, здатних ефективно зброджувати основні цукри у складі лігноцелюлози, важливим є забезпечити одночасне бродіння глюкози й ксилози, а також підвищити

резистентності штамів до різних видів стресу, включаючи стійкість до етанолу та наявність ксилози, що незважаючи на широку розповсюдженість у природі, є менш ефективним субстратом для ферментації порівнюючи із глюкозою.

Тому, метою дисертаційної роботи була метаболічна інженерія процесу спиртового бродіння у дріжджів *O. polymorpha* задля конструювання дріжджових штамів, здатних до підвищеного виходу етанолу при високотемпературній ферментації ксилози (48 - 50°C), що дозволить зробити важливі кроки в напрямку отримання біопалива другого покоління з лігноцелюлози. Метаболічна інженерія полягає у створенні штамів дріжджів, здатних до надпродукції певних метаболітів, або штамів із модифікованими біосинтетичними шляхами за допомогою методів генної інженерії.

Під час ферментації суміші цукрів глюкоза зброджується в першу чергу завдяки наявності високоспоріднених глюкозних транспортерів та високої активності гліколітичних ферментів, гени яких контролюються сильними конститутивними промоторами [66]. Споживання ксилози у дріжджів *O. polymorpha* відбувається лише після повного вичерпання глюкози і обумовлює збільшення тривалості процесу ферментації та зменшує його ефективність.

Одним з підходів підвищення ефективності транспорту ксилози є експресія гетерологічних транспортерів з високою спорідненістю до ксилози в *O. polymorpha*, проте проблемою такого підходу є забезпечення правильної локалізації гетерологічних білків в цитоплазматичній мембрані та уникнення їх швидкої деградації. Альтернативним підходом є ідентифікація та білкова інженерія власних транспортерів *O. polymorpha* для підвищення ефективності транспорту ксилози. У дріжджів, здатних утилізувати ксилозу як джерело Карбону, були виявлені транспортери як з високою, так і з низькою спорідненістю до ксилози, активність яких залежить від концентрації цукру в

середовищі. При високій концентрації ксилози транспорт відбувається шляхом полегшеної дифузії за допомогою низько спорідненої системи транспорту за градієнтом концентрації. При низькій концентрації цукру активується високоспоріднена транспортна система (ксилозо-протонна симпортна система). У дріжджів *S. cerevisiae* транспорт ксилози в клітину забезпечують гексозні транспортери родини Hxt, які мають значно нижчу спорідненість до ксилози порівняно з глюкозою. Був отриманий рекомбінантний штам *S. cerevisiae* з делецією 18 генів *HXT1-17* та *GAL2*, не здатний рости на середовищі з ксилозою та глюкозою [8]. Шляхом експресії кожного з генів *HXT* в делеційному штамі було встановлено, що гени *HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* та *GAL2* відновлювали його ріст на ксилозі [8]. Для створення транспортерів, активність яких не залежить від концентрації глюкози, були застосовані різноманітні підходи білкової інженерії [9, 72].

Для покращення ефективності транспорту ксилози у *O. polymorpha* нами були застосовані успішні підходи білкової інженерії, описані для модифікації Hxt транспортерів *S. cerevisiae*. У геномі штама дикого типу *O. polymorpha* був виявлений функціональний гексозний транспортер Hxt1 з високою гомологією до низькоафінних гексозних транспортерів Hxt1 та Hxt3 *S. cerevisiae*. Внаслідок експресії гена *HXT1* *O. polymorpha* спостерігалось відновлення росту штама *S. cerevisiae* з делецією гексозних транспортерів [10].

Одним з пріоритетних завдань дисертаційної роботи було підвищення питомої швидкості поглинання ксилози. Із цією метою нами створено модифікований Hxt1 *O. polymorpha* шляхом заміни аспарагіну на аланін в положенні 358. Крім того, одним із основних сигнальних шляхів для деградації низькоспорідненого транспортера гексози Hxt1 є убіквітин-залежний протеоліз. Об'єктом убіквітинування є залишки лізину у N-кінцевому домені вищевказаного Hxt1 білка. Відповідні залишки лізину в положенні 8, 9 та 30 було

ідентифіковано як сайти убіквітинування з високою ймовірністю, тому з метою запобігання деградації транспортера з цитоплазматичної мембрани за відсутності глюкози їх було замінено на залишки аргініну. Під час бродіння у тестових середовищах з різними концентраціями цукрів спостерігалася покращена динаміка одночасного споживання глюкози та ксилози штамами із точковою заміною в Hxt1 та штамом з обома модифікаціями. Зокрема, при концентрації 7% глюкози та 3% ксилози, вміст ксилози зменшився за 1 добу до  $14,100 \pm 0,175$  г/л при вихідному вмісті  $30,5 \pm 0,35$  г/л у штамі, що містили обидві модифікації Hxt1. Незважаючи на різницю в динаміці споживання цукрів між трансформантами з модифікаціями Hxt1, всі вони характеризувалися підвищеною продукцією етанолу порівняно зі штамом дикого типу. За допомогою флуоресцентної мікроскопії нами також було проведено оцінку локалізації в мембрані штаму *hxt1Δ O. polymorpha* нативного та модифікованого транспортерів Hxt1. Це дало можливість зробити висновок, що мутагенез трьох залишків лізину в Hxt1 має вагомий вплив на стабільність мембранної локалізації Hxt1. У свою чергу більш тривала локалізація білка в мембрані за умов алкогольної ферментації у середовищі з ксилозою та глюкозою ймовірно обумовлює поліпшену кінетику споживання ксилози та як наслідок підвищення продукції етанолу.

Отже, у результаті даної роботи встановлено, що внаслідок експресії модифікованого ендogenous транспортера Hxt1 спостерігається покращення здатності дріжджів *O. polymorpha* споживати ксилозу під час зброджування суміші ксилози з глюкозою. Отримано рекомбінантні штами *O. polymorpha* з модифікованим транспортером Hxt1, здатні одночасно споживати глюкозу та ксилозу в процесі високотемпературної алкогольної ферментації, що має важливе значення для ефективного споживання основних цукрів гідролізатів лігноцелюлози [11].

Крім цього, як альтернативний спосіб підвищення ефективності транспорту ксилози у роботі застосовано надекспресію модифікованих гетерологічних транспортерів Gal2 та Hxt7 *S. cerevisiae* в *O. polymorpha*. Застосований нами підхід підвищення здатності імпорту ксилози за рахунок експресії гетерологічних транспортерів з високою спорідненістю до ксилози дозволив продемонструвати неефективність відповідного прийому в порівнянні із модифікацією власних гексозних транспортерів. Аналізуючи здатність одночасного споживання обох цукрів та продукцію етанолу за умов ко-ферментації, встановлено, що у батьківського штаму (ВЕР/*cat8Δ*) та штаму із модифікацією Hxt7 спостерігається інгібування транспорту ксилози глюкозою. Рекомбінантні штами *O. polymorpha*, що містять модифікований транспортер Gal2 характеризуються одночасним споживанням цукрів, проте значна їх частка залишається невикористаною. Ймовірно, в клітинах *O. polymorpha* наявні інші потенційні нативні транспортери гексоз, що блокують ефективний транспорт ксилози внаслідок глюкозної репресії. Також, неефективна утилізація ксилози може обумовлюватись проблемою розпізнавання ксилози як вуглецевого субстрату в умовах алкогольної ферментації та присутності глюкози. У той же час залишається невідомим, чи здатні гетерологічні білки транспортерів Hxt7 та Gal2 до правильної конформації та локалізації в цитоплазматичній мембрані *O. polymorpha*.

Надекспресія нативного Hxt1 в геномі найкращого з наявних продуцентів етанолу в *O. polymorpha* (ВЕР/*cat8Δ*) [5] під час зброджування 7% глюкози та 3% ксилози призводить до зниження вмісту ксилози на 4 добу до  $2,020 \pm 0,013$  г/л при вихідному вмісті  $27,01 \pm 0,40$  г/л. Рівень продукції етанолу штамом ВЕР*cat8Δ*/Hxt1\_N358A\_K був вищим на 50% порівняно із батьківським штамом на 48 год ко-ферментації глюкози та ксилози, а також перевищував продукцію



етанолу штамами, що містили модифіковані транспортери Gal2 та Hxt7 на 22% та 10%, відповідно.

Отже, експресія модифікованого ендogenous транспортера Hxt1 в *O. polymorpha* мала найбільш виражений позитивний вплив на одночасне споживання цукрів та продукцію етанолу під час ко-ферментації глюкози та ксилози порівняно з експресією гетерологічних транспортерів Gal2 або Hxt7 *S. cerevisiae*. Однак, наявність та внесок у використання ксилози інших ендogenous транспортерів у дріжджів *O. polymorpha* залишається відкритим питанням.

Таким чином, підходи метаболічної інженерії до транспортерів *HXT* для підвищення їх спорідненості до пентоз або для уникнення їх деградації є перспективними стратегіями для виробництва біоетанолу другого покоління дріжджами *O. polymorpha*.

Інший напрямок дисертаційної роботи полягав у дослідженні впливу пероксисомних ферментів трансальдолази та дигідроксиацетонсинтази на ефективність алкогольної ферментації *O. polymorpha*.

Зацікавленість у цьому напрямку досліджень спровокована попередньо отриманими даними [12], які свідчать про зниження росту та ефективності алкогольної ферментації у дріжджів *O. polymorpha* на середовищі з ксилозою при порушенні біогенезу пероксисом, ймовірно, за рахунок втрати активності асоційованих з цими органелами ферментів. Серед великої кількості ферментів, що наповнюють пероксисомний матрикс, було сконцентровано увагу на дигідроксиацетонсинтазі (ДАС) або пероксисомній транскетолазі (ТКЛ), що залучена в асиміляцію формальдегіду, та трансальдолазі (ТАЛ), що необхідна, як показано в попередніх дослідженнях, для росту на ксилозі як єдиному джерелі Карбону. Ці обидва ферменти залучені в метаболізм похідних ксилози. ДАС є ключовим ферментом метаболізму метанолу у метилотрофних дріжджів, що

каталізує реакцію конденсації формальдегіду та ксилулозо-5-фосфату з утворенням гліцеральдегід-3-фосфату та дигідроксиацетону. Втім, ДАС замість формальдегіду може використовувати рибозо-5-фосфат, функціонуючи таким чином як неспецифічна ТКЛ, що може брати участь разом з ТАЛ в неокисній частині ПФШ.

У дисертаційній роботі досліджено вплив посиленої експресії генів *DAS1* та *TAL2* в геномі штаму 2EthOH/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8Δ* (BER/*cat8Δ*), отриманого методами метаболічної інженерії та класичної селекції, який характеризувався підвищеною продукцією етанолу з ксилози. Внаслідок посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* отримано рекомбінантний штам *O. polymorpha* 2EthOH/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8Δ*/*DAS1*/*TAL2*, який накопичував етанолу в 1,3 рази більше у порівнянні з батьківським штамом. Максимальний титр утвореного етанолу досягав 16 г/л, у той час як вихідний штам накопичував близько 12,5 г/л, а вихід етанолу становив 0,39 г/г ксилози, що є найкращим результатом серед усіх рекомбінантних штамів *O. polymorpha*. Отриманий результат більше ніж у 40 разів перевищує рівень продукції етанолу з ксилози в порівнянні із штамми *O. polymorpha* дикого типу, а також може конкурувати із такими відомими продуцентами етанолу як *S. stipitis* (0,35-0,44 г/г при 30 °C) [48], *S. passalidarum* (0,42 г/г при 30 °C) [49] та *K. marxianus* (0,38 г/г при 42 °C) [44].

Отже, надекспресія пероксисомних ферментів дигідроксиацетонсинтази та трансальдолази призводить до покращення здатності перетворювати ксилузу до етанолу у метилотрофних термотолерантних дріжджів *O. polymorpha*, однак механізм дії пероксисомних ферментів на алкогольну ферментацію ксилози залишається невідомим і потребує подальшого дослідження.

Отримані експериментальні дані, які свідчать про роль пероксисомних ферментів ДАС та ТАЛ в алкогольній ферментації ксилози, стимулюватимуть

дослідження, скеровані на вивчення ролі пероксисом як органел, в алкогольній ферментації ксилози та підтверджують, що неокиснювальна частина пентозофосфатного шляху є одним з лімітуючих етапів конверсії ксилози до етанолу у дріжджів *O. polymorpha*.

Іншою проблемою, яка виникає під час ферментації гідролізатів лігноцелюлози, є присутність різноманітних токсичних сполук, які вивільняються під час гідролізу та інгібують ріст, життєздатність та ферментативну активність дріжджів [193]. Посилення експресії генів, які забезпечують резистентність до токсичних інгібіторів гідролізатів, є перспективним для створення штамів толерантних до різних видів стресу. Трипептид глутатіон (GSH) є однією з основних сполук, що беруть участь в захисті клітин від численних стресових чинників, проте роль GSH в захисті клітин дріжджів в стресових умовах алкогольної ферментації дотепер залишалася недослідженою.

У даній роботі було отримано рекомбінантні штами *O. polymorpha*, що характеризуються одним з найкращих показників продукції глутатіону, шляхом ко-експресії гена *MET4* в попередньо отриманому штамі з посиленою експресією гена *GSH2* (*mcGSH2*). В результаті одночасного посилення експресії генів *GSH2* та *MET4* вміст глутатіону в клітинах штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* досягав 837 нмоль/мг білка, що у 1,8 та 4,4 раза вище, ніж у штамів *mcGSH2* та WT, відповідно. Максимальна внутрішньоклітинна продукція глутатіону штамом *mcGSH2/MET4(pGAP)* становила 2167 мг/л, що у 5 і 1,8 раза більше порівняно з WT та *mcGSH2*. В перерахунку на суху біомасу вміст глутатіону в штамі *mcGSH2/MET4(pGAP)* становив 134 мг/г сухої біомаси клітин.

Також, позитивний ефект одночасного посилення експресії *GSH2* та *MET4* спостерігався у напівпромислових умовах культивування. Крім цього, з'ясовано, що продукція глутатіону рекомбінантними штамми дріжджів *O. polymorpha*,

значно залежить від параметрів вирощування (наявності кисню, рН, швидкості перемішування), вуглецевого субстрату та типів надмірно експресованих генів біосинтезу глутатіону та його попередників.

Додатково (не було метою дисертаційної роботи), визначено вміст позаклітинного глутатіону під час культивування штамів *O. polymorpha* (WT, *mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)*) на середовищі YNB в аеробних умовах при 37 °С. Встановлено, що *mcGSH2/MET4(pGAP)* здатен продукувати в 2 рази більше позаклітинного глутатіону на п'ятий день культивування порівняно зі штамом дикого типу, досягаючи 187 мкмоль/л. Проте, штами *mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* не відрізнялися кількістю утвореного глутатіону, що вказує на відсутність будь-якого впливу транскрипційного активатора Met4 на нагромадження глутатіону за межами клітини.

Порівнюючи конкурентноспроможність отриманого рекомбінантного штаму дріжджів *O. polymorpha* з відомими сьогодні промисловими продуцентами глутатіону, варто відміти, що штам *mcGSH2/MET4(pGAP)* характеризується одним з найкращих показників продукції цього трипептиду, оскільки дріжджі *S. cerevisiae* нагромаджують 2020 - 2100 мг/л [195, 196], штами *C. utilis* максимально здатні продукувати 2248 мг/л глутатіону [197], промислові бактерійні штами *Lactococcus lactis* - 1377 мг/л [198]. Втім, існують також і штами, що характеризуються значно вищими показниками, наприклад модифіковані бактерійні штами *E. coli*, що містять біфункціональну глутатіонсинтетазу *gshF* *Streptococcus thermophilus*, нагромаджують 15210 мг/л [199], *Pichia pastoris* - 4150 мг/л [140], та деякі комерційні штами *S. cerevisiae* й *Saccharomyces bayanus* [200, 201]. Таким чином, рекомбінантні штами дріжджів *O. polymorpha mcGSH2/MET4(pGAP)* мають хороші перспективи для подальшого вдосконалення, особливо для виробництва позаклітинної форми глутатіону.

Крім цього, показано, що підвищення рівня внутрішньоклітинного GSH покращує ефективність алкогольної ферментації ксилози при 45 °С, проте, не впливає на алкогольну ферментацію глюкози та бродіння в цілому при 37 °С. Штами *O. polymorpha mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* під час алкогольної ферментації ксилози при 45 °С характеризувалися у 3 рази підвищеною продукцією етанолу порівняно із штамом дикого типу на 2 добу культивування за умов обмеженої аерації. Отриманий результат свідчить про позитивний вплив глутатіну на продукцію етанолу за умов підвищеної температури як стресового чинника, а також за наявності ксилози. Проте, з'ясування, які саме фізіологічні особливості дріжджів *O. polymorpha* обумовлюють зв'язок глутатіону та алкогольної ферментації ксилози, потребує подальших експериментальних досліджень. Припускаємо, що маючи усі гени, необхідні для утилізації та ферментації ксилози, експресія необхідних транспортерів та ферментів в *O. polymorpha* залишається надзвичайно низькою, особливо у присутності глюкози, що вказує на те, що ці дріжджі не мають ефективною системи цукрової сигналізації для утилізації ксилози. Таким чином, в клітинах, які активно метаболізують зазначену пентозу, внутрішньоклітинна ксилоза викликає сигнал, подібний до вуглецевого голодування, ймовірно, спричиняючи низькі показники асиміляції, що спостерігаються й за умов використання інших пентозних субстратів [194]. Додатково ксилоза створює частковий інгібуючий ефект, відмінний від нестачі глюкози, запускаючи реакції пов'язані із відповіддю на окиснювальний стрес за участю глутатіону.

Отже, в результаті проведеної роботи розроблено нові молекулярні підходи для дріжджів *O. polymorpha*, що доповнюють арсенал відомих методів і роблять цей вид зручним модельним об'єктом для дослідження регуляції біосинтезу глутатіону та ідентифікації низки лімітуючих етапів шляху перетворення ксилози до етанолу в процесі високотемпературної алкогольної ферментації.

За допомогою поєднання методів метаболічної інженерії та класичної селекції було сконструйовано штами ксилософерментуючих дріжджів з покращеними параметрами високотемпературної алкогольної ферментації. Також, в результаті проведеної роботи встановлено зв'язок між підвищеною здатністю до накопичення глутатіону та ефективністю продукції етанолу в умовах алкогольної ферментації ксилози.

Створені рекомбінантні штами зазначених дріжджів можуть використовуватись як основа для створення промислових продуцентів етанолу другого покоління та глутатіону. Опрацьовані у роботі підходи можуть бути застосовані для метаболічної інженерії інших практично важливих штамів дріжджів.

## ВИСНОВКИ

У результаті виконання дисертаційної роботи було розроблено оригінальні підходи та сконструйовано рекомбінантні штами-надпродуценти етанолу та глутатіону на основі метилотрофних дріжджів *O. polymorpha*. Основні наукові та практичні результати роботи викладено у наступних висновках:

1. Сконструйовано модифіковані форми транспортера Hxt1 *O. polymorpha* із заміною залишків лізину на N-кінці білка (заміна сайтів убіквітинування) та заміною аспарагіну на аланін в положенні 358. Отримано штами дріжджів *O. polymorpha* з посиленою експресією ізоформ гена *HXT1*, що кодує нативну або модифіковані форми транспортера Hxt1;

2. За допомогою флуоресцентної мікроскопії підтверджено, що мутагенез Hxt1 обумовлює збільшення тривалості локалізації цього білка в мембрані клітин *O. polymorpha* за наявності ксилози як вуглецевого субстрату;

3. Сконструйовано штами дріжджів *O. polymorpha* з модифікованим геном *HXT7 S. cerevisiae* в положенні 370 шляхом заміни аспарагіну на фенілаланін та з модифікованим геном *GAL2 S. cerevisiae* в положенні 376 шляхом заміни аспарагіну на серин та осліджено вплив здійснених модифікацій транспортерів Hxt1, Hxt7 та Gal2 на ефективність споживання ксилози та глюкози дріжджами *O. polymorpha* в умовах високотемпературної алкогольної ферментації;

4. Встановлено, що введення модифікованих транспортерів Hxt1 *O. polymorpha* в геном покращеного продуцента етанолу з ксилози обумовлює одночасне споживання обидвох цукрів за умов високотемпературної алкогольної ферментації 7% глюкози та 3% ксилози. Продукція етанолу досягає  $27,560 \pm 0,127$  г/л на другу добу ферментації в порівнянні з найкращим отриманим продуцентом, рівень продукції етанолу якого становить  $18,230 \pm 0,096$  г/л;

5. Здійснено посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* в геномі штаму

2EthOH<sup>-</sup>/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8Δ*, отриманого методами метаболічної інженерії та класичної селекції з підвищеною продукцією етанолу з ксилози.

Отриманий рекомбінантний штам 2EthOH<sup>-</sup>/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8Δ*/DAS1/TAL2 накопичував етанолу в 1,3 рази більше у порівнянні з батьківським штамом. Максимальний титр утвореного етанолу досягав 16 г/л, що є найкращим результатом серед усіх рекомбінантних штамів *O. polymorpha*;

6. Сконструювано штами дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону за рахунок надекспресії гена транскрипційного активатора Met4 та гена першого фермента біосинтезу глутатіону *GSH2*. Встановлено позитивний вплив підвищеного рівня внутрішньоклітинного глутатіону на продукцію етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації у *O. polymorpha*.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lennartsson P, Erlandsson P, Taherzadeh M. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresour Technol.* 2014;165:3–8.
2. Technology Roadmap - Biofuels for Transport [Internet]. Available from: <http://www.iea.org/tcep/transport/biofuels>.
3. Jeffries T, Jin Y. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004;63:495–509.
4. Zaldivar J, Nielsen J. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Microbiol Biotechnol.* 2001;56:17–34.
5. Ruchala J, Kurylenko O, Soontorngun N, Dmytruk K, Sibirny A. Transcriptional activator Cat8 is involved in regulation of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):36.
6. Hamacher T. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology.* 2002;148(9):8–31.
7. Shin H, Nijland J, de Waal P, de Jong R, Klaassen P, Driessen A. An engineered cryptic Hxt11 sugar transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* 2015;8(2):176.
8. Nijland J, Shin H, Jong R, Waal P, Klaassen P, Driessen A. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* 2014;9:1–11.
9. Nijland J, Vos E, Shin H, de Waal P, Klaassen P, Driessen A. Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* 2016;9:158.

10. Stasyk O, Mykola M, Stasyk O, Dijck P, Thevelein J, Sibirny A. Identification of hexose transporter-like sensor HXS1 and functional hexose transporter HXT1 in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Eukaryot Cell*. 2008;7(4):735–746.
11. Vasylyshyn R, Kurylenko O, Ruchala J, Shevchuk N, Kuliesiene N, Khroustalyova G, et al. Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast. *Microbial Cell Factories*. 2020;19:96.
12. Kurylenko O, Ruchala J, Vasylyshyn R, Stasyk O, Dmytruk O, Dmytruk K, et al. Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11:197.
13. Dringen R, Gutterer J, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*. 2000;267(16):4912–16.
14. Ubiyvovk V, Nazarko T, Stasyk O, Jeong M, Ah H, Sibirny A. *GSH2*, a gene encoding  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res*. 2002;2:327–332.
15. Ubiyvovk V, Blazhenko O, Zimmermann M, Sohn M, Kang H. Cloning and functional analysis of the *GSH1/MET1* gene complementing cysteine and glutathione auxotrophy of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Укр біохім журн*. 2011;83:67–81.
16. Yurkiv M, Kurylenko O, Vasylyshyn R, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of the efficient glutathione producers in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds: Monograph*. University of Rzeszow. 2015;11(5):323–332.
17. Yurkiv M, Kurylenko O, Vasylyshyn R, Skorohod V, Sibirny A. Development of glutathione production technology based on designed active yeast overproducers. *Science and Innovation*. 2015;11(5):53–60.

18. Yurkiv M, Kurylenko O, Vasylyshyn R, Dmytruk K, Fickers P, Sibirny A. Gene of the transcriptional activator *MET4* is involved in regulation of glutathione biosynthesis in the methylotrophic yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *FEMS Yeast Research*. 2018;18(2):96–102.
19. Gasoline and Diesel Fuel, European Automobile Manufacturers Association. Worldwide Fuel Charter. 2019. [Internet]. Available from: <https://www.acea.be/publications/article/worldwide-fuel-charter-2019-gasoline-and-diesel-fuel>.
20. Jeffries T, Jin S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* 2000;47:221–268.
21. World Fuel Ethanol Production [Internet]. Available from: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry>
22. Lynd L. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass : technology, economics, the environment, and policy. *Ann Rev Energy Env.* 1996;21:403–465.
23. Сибірний А. Біопаливний етанол з лігноцелюлози (рослинної біомаси): досягнення, проблеми, перспективи. *Вісн НАН України*. 2006.3:32–48.
24. Ho S, Huang S, Chen C, Hasunuma T, Kondo A. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour Technol.* 2013;135:191–198.
25. Farrell A, Plevin R, Turner B, Jones A, Hare M, Kammen D. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*. 2016;311:506–508.
26. Nishiyama Y, Langan P, Chanzy H. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I $\beta$  from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 2002;124 (31):9074–82.
27. Saha B. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 200330(5):279-291.

28. Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels*. 2008;1(1):7.
29. Sewsynker-Sukai Y, Gueguim K. Simultaneous saccharification and bioethanol production from corn cobs: Process optimization and kinetic studies. *Bioresour Technol*. 2018;262:32–41.
30. Wyman C. Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology: selected key events along the way. *Appl Biochem Biotechnol*. 2001;91(93):5–21.
31. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee Y, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 2005;96:673–686.
32. Moulthrop J, Swatloski R, Rogers R. High-resolution <sup>13</sup>C NMR studies of cellulose and cellulose oligomers in ionic liquid solutions. *Chem Commun*. 2005;46:1557–59.
33. Gao X, Kumar R, Singh S, Simmons B, Balan V, Dale B, et al. Comparison of enzymatic reactivity of corn stover solids prepared by dilute acid, AFEX™, and ionic liquid pretreatments. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7:71.
34. Kang Q, Appels L, Tan T, Dewil R. Bioethanol from Lignocellulosic Biomass : Current Findings Determine Research Priorities. *Sci. World J*. 2014;2014:1–13.
35. Liu Z, Qin L, Jin M, Pang F, Li B, Kang Y, et al. Evaluation of storage methods for the conversion of corn stover biomass to sugars based on steam explosion pretreatment. *Bioresour Technol*. 2013;132:5–15.
36. Almeida J, Runquist D, Sánchez N, Lidén G, Gorwa-Grauslund M. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J*. 2011;6(3):286–299.

37. Kim O, Suwannarangsee S, Oh D, Kim S, Seo J. Transcriptome analysis of xylose metabolism in the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013;59:188–199.
38. Hahn-Hägerdal B, Wahlbom C, Gárdonyi M, van Zyl W, Cordero O, Jönsson L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv Biochem Eng/Biotechnol*. 2010;73:53–84.
39. Horn S, Vaaje-kolstad G, Westereng B, Eijsink V. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2012;5:45.
40. Beckner M, Ivey M, Phister T. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53(4):387–394.
41. Fonseca B, Moutta R, Ferraz F, Vieira E, Nogueira A, Baratella B, et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38(1):199–207.
42. Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *J Biosci Bioeng*. 2008;106(2):128–133.
43. Gutiérrez T, Ingram O, Preston F. Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LYO1--an enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production. *J Biotechnol*. 2006;121(2):154–164.
44. Wang R, Li L, Zhang B, Gao X, Wang D, Hong J. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2013;40(8):841–854.
45. Brigham J, Adney W, Himmel M Hemicelluloses: diversity and applications. *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Washington DC. 1996;13:119–142.

46. Jeroen N, Driessen A. Engineering of Pentose Transport in *Saccharomyces cerevisiae* for Biotechnological Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;56:89–96.
47. Fitzpatrick J, Kricka W, James TC, Bond U. Expression of three *Trichoderma reesei* cellulase genes in *Saccharomyces pastorianus* for the development of a two-step process of hydrolysis and fermentation of cellulose. *J Appl Microbiol.* 2014;16:96–108.
48. Jeffries T, Grigoriev I, Grimwood J, Laplaza J, Aerts A, Salamov A, et al. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol.* 2007;25(3):319–326.
49. Long T, Su Y, Headman J, Higbee A, Willis L, Jeffries T. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl Env. Microbiol.* 2012; 78:5492–500.
50. Zhang J, Zhang B, Wang D, Gao X, Sun L. Rapid ethanol production at elevated temperatures by engineered thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* via the NADP(H)-preferring xylose reductase-xylitol dehydrogenase pathway. *Metab Eng.* 2015;31:140–152.
51. Gárdonyi M, Hahn-hägerdal B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzym Microb Technol.* 2003;32:252–259.
52. Madhavan A, Tamalampudi S. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;82:1067–78.
53. Vandeska E, Kuzmanova S, Jeffries W. Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. 1995;80:513–516.
54. Jin Y, Ni H, Laplaza J, Jeffries T. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *Appl Env. Microbiol.* 2003;69:495–503.
55. Дмитрук О, Дмитрук К, Вороновський А, Сибірний А. Метаболічна

інженерія початкових етапів катаболізму ксилози у дріжджів з метою конструювання ефективних продуцентів етанолу з лігноцелюлози. Цитологія і генетика. 2008.42:70–84.

56. Van Maris A, Abbott D, Bellissimi E, van den Brink J, Kuiper M, Luttik M, et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;90:391–418.

57. Kricka W, Fitzpatrick J, Bond U. Challenges for the production of bioethanol from biomass using recombinant yeasts. *Adv Appl Microbiol Microbiol*. 2015;92:89–125.

58. Johansson R, Christensson C, Hobbey T, Hahn-Hagerdal, B. Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Appl Env Microbiol*. 2001;67:4249–55.

59. Karhumaa K, Fromanger R. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;73:1039–46.

60. Kuiper M, Toirkens M, Diderich J, Winkler A, Van Dijken J, Pronk J. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res*. 2005;5:925–934.

61. Bera A, Ho N, Khan A, Sedlak M. A genetic overhaul of *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) to improve xylose fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38:617–626.

62. Karhumaa K, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund M. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. *Yeast*. 2005;22(5):359–68.

63. Verhoeven M, Misun L, Lycka K, Marcel B, Dick J, Jean-Marc D, et al. Mutations in PMR1 stimulate xylose isomerase activity and anaerobic growth on

xylose of engineered *Saccharomyces cerevisiae* by influencing manganese homeostasis. *Yeast*. 2017;7:46–55.

64. Baldwin S, Henderson P. Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:459–471.

65. Nijland J, Driessen G. Engineering of pentose transport in *Saccharomyces cerevisiae* for biotechnological applications. *Front Biotech Bioeng*. 2020;7:464.

66. Subtil T, Boles E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 2012;5:14.

67. Maier A, Völker B, Boles E, Fuhrmann G. Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res*. 2002;2(4):539–550.

68. Reifenberger E, Freidel K, Ciriacy M Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol*. 1995;16(1):157–167.

69. Diderich J, Schepper M, van Hoek P, Luttk M, van Dijken J, Pronk J, et al. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1999;274(22):15350–59.

70. Buziol S, Warth L, Magario I, Freund A, Siemann-Herzberg M, Reuss M. Dynamic response of the expression of hxt1, hxt5 and hxt7 transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae* to perturbations in the extracellular glucose concentration. *J Biotechnol*. 2008;134(3-4):203–210.

71. Saloheimo A, Rauta J, Stasyk O. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;74:1041–52.

72. Farwick A, Bruder S, Schadeweg V, Oreb M, Boles E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(14):5159–64.



73. Ozcan S, Freidel K, Leuker A, Ciriacy M. Glucose uptake and catabolite repression in dominant HTR1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1993;175(17):5520–28.
74. Lagunas R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;10(3-4):229–242.
75. Reznicek O, Facey S, de Waal P, Teunissen A, de Bont J, Nijland J, et al. Improved xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* due to directed evolution of galactose permease Gal2 for sugar co-consumption. *J Appl Microbiol.* 2015;119(1):99–111.
76. Li H, Shen Yu, Wu M, Hou J, Jiao C, Li Z, Liu X, Bao X. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production *Bioresour Bioprocess* 2016;3(1):51.
77. Nijland J, Shin H, de Waal P, Klaassen P, Driessen A. Increased xylose affinity of Hxt2 through gene shuffling of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 2018;124(2):503–510.
78. Snowdon C, van der Merwe G. Regulation of Hxt3 and Hxt7 turnover converges on the Vid30 complex and requires inactivation of the Ras/cAMP/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 2012;7(12):504–558.
79. Ozcan S, Johnston M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(3):554–569.
80. Verwaal R, Johannes P, Henkamp A, Verkleij A, Verrips T, Boonstra J. HXT5 expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2002;19(12):1029–38.
81. Shin H, Nijland J, de Waal P, Driessen A. The amino-terminal tail of Hxt11 confers membrane stability to the Hxt2 sugar transporter and improves xylose fermentation in the presence of acetic acid. *Biotechnol Bioeng.* 2017;114(9):1937–45.
82. Zhou H, Cheng J, Wang B, Fink G, Stephanopoulos G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and

evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng.* 2012;14:611–622.

83. Tomás-Pejó E, Olsson L. Influence of the propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucose in lignocellulosic hydrolysates. *Microbiol Biotechnol.* 2015;8:999–1005

84. Kruckeberg A, Ye L, Berden J A, van Dam K. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem J.* 1999;339(2):299–307.

85. Krampe S, Stamm O, Hollenberg C, Boles E Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* 1998;441(3):343–7.

86. Takanori T, Tomonori I, Chiaki O, Naoto O, Takayuki O, Akihiko K. Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* harboring a xyloseisomerase pathway. *J Biosci Bioeng.* 2012;114(2):209–211.

87. Guirimand G, Takahiro B, Mami M, Kentaro I, Kenta M, Yuki K, et al. Combined Cell Surface Display of  $\beta$ -d-Glucosidase (BGL), Maltose Transporter (MAL11), and Overexpression of Cytosolic Xylose Reductase (XR) in *Saccharomyces cerevisiae* Enhance Cellobiose/Xylose Couitilization for Xylitol Bioproduction from Lignocellulosic. *Biomass Biotechnol J.* 2019;14(9):89–96.

88. Lane S, Haiqing X, Eun J, Kim H, Lesmana A, Jeong D, et al. Glucose repression can be alleviated by reducing glucose phosphorylation rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep.* 20188(1):2613.

89. Olofsson K, Runquist D, Hahn-Hägerdal B, Lidén G. A mutated xylose reductase increases bioethanol production more than a glucose/xylose facilitator in simultaneous fermentation and co-fermentation of wheat straw. *AMB Express.* 2011;28;1(1):4.

90. Diao L, Liu Y, Qian F, Yang J, Jiang Y, Yang S. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. *BMC Biotechnol.* 2013;13:110.
91. Runquist D, Hahn-Hägerdal B, Rådström P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* 2010;3(7):5.
92. Weierstall T, Hollenberg C, Boles E. Cloning and characterization of three genes (*SUT1-3*) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Mol Microbiol.* 1999;31:871–883.
93. Young E, Ashley P, Comer A, Bailey A, Alper H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(10):3311–19.
94. Young E, Comer A, Huang H, Alper H. Molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng.* 2012;14(4):401–411.
95. de Sales B, Scheid B, Gonçalves D, Knychala M, Matsushika A, Bon E, et al. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 2015;37(10):1973–82.
96. Kim H, Lee H, Park H, Lee D, Boles E, Chung D, et al. Enhanced production of xylitol from xylose by expression of *Bacillus subtilis* arabinose:H<sup>+</sup> symporter and *Scheffersomyces stipitis* xylose reductase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* 2017;107:7–14.
97. Kang H, Gellissen G. Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression systems. 2005;7(4):36–52.
98. Riley R, Haridas S, Wolfe K, Lopes M, Todd C, Göker M. Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:9882–87.

99. Ryabova O, Chmil O, Sibirny A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res. 2003;4:157–164.
100. Dmytruk K, Sibirny A. Metabolic engineering of yeast *Hansenula polymorpha* for construction of efficient ethanol producers. Tsitol Genet. 2013;47:329–342.
101. Ishchuk O, Abbas C, Sibirny A. Heterologous expression of *Saccharomyces cerevisiae* *MPRI* gene confers tolerance to ethanol and L-azetidine-2-carboxylic acid in *Hansenula polymorpha*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010;37:213–218.
102. Guerra E, Chye P, Berardi E, Piper P. Hypoxia abolishes transience of the heat-shock response in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Microbiology. 2018;151(4):805–811.
103. Ishchuk O, Voronovsky A, Abbas C, Sibirny A. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance. Biotechnol Bioeng. 2009;104:911–919.
104. Voronovsky A, Ryabova O, Verba O, Ishchuk O, Dmytruk K, Sibirny A. Expression of *xylA* genes encoding xylose isomerases from *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Microbiol Lett. 2005;5:1055–62.
105. Petschacher B, Nidetzky B. Engineering *Candida tenuis* xylose reductase for improved utilization of NADH: antagonistic effects of multiple side chain replacements and performance of site-directed mutants under simulated in vivo conditions. Appl Env. Microbiol. 2005;71: 6390–93.
106. Ishchuk O, Voronovsky A, Stasyk O, Gayda G, Gonchar M, Abbas C, et al. Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature fermentation of xylose. FEMS Yeast Res. 2008;8:1164–74.

107. Kurylenko O, Semkiv M, Ruchala J, Kshanovska B, Abbas C, Dmytruk K, Sibirny A. New approaches for improving the production of the 1st and 2nd generation ethanol by yeast. *Acta Biochim Polon.* 2016;63:1156.
108. Ganapathy-Kanniappan S, Vali M, Kunjithapatham R, Buijs M, Syed L, Rao P, Ota S, Kwak B, et al. 3-bromopyruvate: a new targeted antiglycolytic agent and a promise for cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11:510–517.
109. Dmytruk K, Ruchala J, Grabek-Lejko D, Puchalski C, Bulbotka N, Sibirny A. Autophagy-related gene *ATG13* is involved in control of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. *FEMS Yeast Res.* 2018;18:189–203.
110. Kurylenko O, Ruchala J, Hryniv O, Abbas C, Dmytruk K, Sibirny A. Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation. *Microb Cell Fact.* 2014;13:122.
111. Roermund C, Waterham H, Ijlst L, Wanders R. Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003;60(9):1838–51.
112. Sibirny A. Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Res.* 2016;16:38.
113. Idnurm A, Giles S, Perfect J, Heitman J. Peroxisome function regulates growth on glucose in the basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2007;6:60–72.
114. Freitag J, Ast J, Bo M. Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature.* 2012;485:522–525.
115. Strijbis K, Visser W, Distel B. Alternative splicing directs dual localization of *Candida albicans* 6-phosphogluconate dehydrogenase to cytosol and peroxisomes. *FEMS Yeast Res.* 2012;12:61–68.
116. Rußmayer H, Buchetics M, Gruber C, Valli M, Grillitsch K, Modarres G, et al. Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle. *BMC Biol.* 2015;13:80.

117. Hansen H, Didion T, Thiemann A, Veenhuis M, Roggenkamp R. Targeting sequences of the two major peroxisomal proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Mol Gen Genet*. 1992;235:269–278.
118. Sakai Y, Nakagawa T, Shimase M, Kato N. Regulation and physiological role of the *DAS1* gene, encoding dihydroxyacetone synthase, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J Bacteriol*. 1998;180:5885–90.
119. Gödecke A, Veenhuis M, Roggenkamp R, Janowicz Z, Hollenberg C. Biosynthesis of the peroxisomal dihydroxyacetone synthase from *Hansenula polymorpha* in *Saccharomyces cerevisiae* induces growth but not proliferation of peroxisomes. *Curr Genet*. 1989;16:13–20.
120. Scirè A, Cianfruglia L, Minelli C, Bartolini D, Torquato P, Principato G, et al. Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways. *BioFactors Oxf. Engl*. 2019;45:152–168.
121. Aquilano K, Baldelli S, Rosa M. Glutathione is a crucial guardian of protein integrity in the brain upon nitric oxide imbalance. *Commun Integr Biol*. 2011;4(4):477–479.
122. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 2015;6:183–197.
123. Popov D. Protein S-glutathionylation: From current basics to targeted modifications. *Arch. Physiol. Biochem*. 2014;120:123–130.
124. Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton J, Turner N. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr*. 2004;134:489–492.
125. Lei X. In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: Evidence from knockout mice. *Methods Enzymol*. 2002;347:213–225.
126. Hanschmann E.-M, Godoy J, Berndt C, Hudemann C, Lillig C. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins – molecular mechanisms and health significance: From cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid. Redox Signal*. 2013;19:1539–605.

127. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo M. Glutathione: New roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* 2014;5:196.
128. Das T, Javadzadeh A, Dey A, Sabesan P, Théberge J, Radua J, et al. Antioxidant defense in schizophrenia and bipolar disorder: A meta-analysis of MRS studies of anterior cingulate glutathione. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2019;91:94–102.
129. Townsend D, Tew K, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 2003;57:145–155.
130. Kozhemyakin L, Balasovski M. Methods for production of the oxidized glutathione composite with CIS-diamminedichloroplatinum and pharmaceutical compositions based thereof regulating metabolism, proliferation, differentiation and apoptotic mechanisms for normal and transformed cells. US patent 7371411.2008.
131. Desideri E, Ciccarone F, Rosa M. Ciriolo Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *MDPI journals [Internet].* 2019;16. Available from: doi: 10.3390/nu11081926.
132. Harington T, Mead H. Synthesis of glutathione. *The Biochemical Journal.* 1935;29(7):1602–1611.
133. Li Y, Wei G, Chen J. Glutathione: A review on biotechnological production. *Microbiology and Biotechnology.* 2004;66(3):233–242.
134. Langer R, Hamilton B, Gardner C, Archer M, Colton C. Enzymatic regeneration of ATP. I. Alternative routes. *AIChE Journal.* 1976;22(6):1079–90.
135. Pocsí I, Prade R, Penninckx M, et al. Altruistic Metabolite in Fungi. *Advances in Microbial Physiology.* 2004;49(14):13–86.
136. Bachhawat A, Ganguli D, Kaur J, Kasturia N, Thakur A, Kaur H, et al. Glutathione production in yeast. *Yeast Biotechnology.* 2009;9:259–280.
137. Hartner F, Glieder A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact.* 2006; 5:39–60.

138. Hara K, Kentaro K, Akiko I, Hideki N, Akihiko K. Improvement of glutathione production by metabolic engineering the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94(5):1313–19.
139. Patzschke A, Steiger Matthias, Holz C, Lang C, Mattanovich D, Sauer M. Enhanced glutathione production by evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol J*. 2015;10(11):1719–26.
140. Fei L, Wang Y, Chen S. Improved glutathione production by gene expression in *Pichia pastoris*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2009;32(6):729–735.
141. Ubiyvovk V, Ananin V, Malyshev A, et al. Optimization of glutathione production in batch and fedbatch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *BMC Biotechnol*. 2011;11:8.
142. Dalton T, Chen Y, Schneider S, Nebert D, Shertzer H. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(10):1511–26.
143. Copley S, Jasvinder D. Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biol*. 2002;3(5): 25–29.
144. Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. Glutathione metabolism in yeasts and construction of the advanced producers of this tripeptide. Springer nature Switzerland. *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. 2019;6:569–698.
145. Yang Yi, Dieter M, Chen Y, Shertzer H, Nebert D, Dalton T. Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse: Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *J Biol Chem*. 2002;277(51):49446–52.
146. Janowiak B, Griffith O. Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae*. One protein accounts for gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11829–39.
147. Vergauwen B, Dirk D, Jozef J. Characterization of the bifunctional gamma-glutamate-cysteine ligase/glutathione synthetase (GshF) of *Pasteurella multocida*. *J Biol Chem*. 2006;281(7):4380–94.



148. Vergauwen B, Ruben V, Ann D, Savvas N. Delineation of the Pasteurellaceae specific GbpA-family of glutathione-binding proteins. *BMC Biochem.* 2011;12:59.
149. Wheeler J, Stourman N, Armstrong R, Guengerich F. Conjugation of haloalkanes by bacterial and mammalian glutathione transferases: mono- and vicinal dihaloethanes. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(8):1107–17.
150. Gulshan K, Rovinsky S, Coleman S, Moye-Rowley S. Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J Biol Chem.* 2005;280(49):40524–33.
151. Sugiyama K, Izawa S, Inoue Y. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2000;275(20):15535–40.
152. Wieland G, Hemmerich P, Koch M, Stoyan T, Hegemann J, Diekmann S. Determination of the binding constants of the centromere protein Cbf1 to all 16 centromere DNAs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(5):1054–60.
153. Verma V, Gupta R, Goel M. Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies. *Biol Direct.* 2015;10:49.
154. Wickham S, West M, Cook P, Hanigan M. Gamma-glutamyl compounds: substrate specificity of gamma-glutamyl transpeptidase enzymes. *Anal Biochem.* 2011;414:208–214.
155. Kumar C, Sharma R, Bachhawat A. Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;219:187–194.
156. Ganguli D, Kumar C, Bachhawat A. The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2007;175:1137–51.

157. Bachhawat A, Kaur A. Glutathione degradation. *Antioxid Redox Signal*. 2017;27:1200–16.
158. Tsunoda S, Avezov E, Zyryanova A, Konno T, Mendes-Silva L, Melo E, et al. Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants. *Elife*. 2017;3:34–41.
159. Fujiwara S, Kawazoe T, Ohnishi K, Kitagawa T, Popa C, Valls M, et al. RipAY, a plant pathogen effector protein, exhibits robust  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase activity when stimulated by eukaryotic thioredoxins. *J Biol Chem*. 2016;291:6813–30.
160. Mehdi K, Penninckx M. An important role for glutathione and Y-glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 1997;143:1885–89.
161. Elskens M, Jaspers C, Penninckx M. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. 1991;137:637–644.
162. Liang G, Du G, Chen J. Enhanced glutathione production by using low-pH stress coupled with cysteine addition in the treatment of high cell density culture of *Candida utilis*. *Letters in applied microbiology*. 2008;46(5):507–512.
163. Bourbouloux A, Shahi P, Chakladar A, et al. Hgt1p, A high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2000;275:13259–65.
164. Dhaoui M, Auchère F, Blaiseau P, et al. Gex1 is a yeast glutathione exchanger that interferes with pH and redox homeostasis. *Mol Biol Cell*. 2011;22:2054–67.
165. Ballatori N, Krance S, Marchan R, Hammond C. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol. Aspects Med*. 2009;30:13–28.
166. Franco R., Cidlowski J. Glutathione efflux and cell death. *Antioxid. Redox Signal*. 2012;17:1694–713.

167. Perrone G, Grant C, Dawes I. Genetic and environmental factors in Wuencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 2005;16(1):218–230.

168. Grabek-Lejko D, Kurylenko O, Sibirny V, Ubiyvovk V, Penninckx M, Sibirny A. Alcoholic fermentation by wild-type *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* versus recombinant strains with an elevated level of intracellular glutathione. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38(11):1853–59.

169. Piper P. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;134:121–127.

170. Alexandre H, Ansanay-galeote V, Dequin S, Blondin B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 2001;498:98–103.

172. Daehee J, Hahn S. Roles of the Yap1 Transcription Factor and Antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*s Tolerance to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural, Which Function as Thiol-Reactive Electrophiles Generating Oxidative Stress. *Environ Microbiol*. 2013;79(16): 5069–77.

173. Ma M, Liu Z. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover *YAP1*, *PDR1*, *PDR3*, *RPN4*, and *HSF1* as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2010;11:660.

174. Allen S, Clark W, McCaffery J, Cai Z, Lanctot A, Slininger P, Liu Z, Gorsich S. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*. 2010;3:2–11.

175. Miller E, Jarboe L, Turner P, Pharkya P, Yomano L, York S, et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Appl. Environ. Microbiol*. 2006;75:6132–41.

176. Matsufuji Y, Yamamoto K. Novel physiological roles for glutathione in sequestering acetaldehyde to confer acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:297–303.

177. Gellisen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;54:741–750.
178. Neidhardt F, Curtiss R. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. *J. Bacteriol.* 1996;135(16):145–157.
179. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Association at WileyInterscience. 1990; 1(2):9.
179. Taxis C, Knop M. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques.* 2006;40:73-78.
180. Lowry O, Rosebrough N, Farr A. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265–275.
181. Waites M, Quayle J. Dihydroxyacetone synthase: a special transketolase for formaldehyde fixation from the methylotrophic yeast *Candida boidinii* CBS 5777. *J Gen Microbiol.* 1983;129:935–944.
182. Bergmeyer H, Gawehn K. *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press. 1974;78:12–34.
183. Johnston J. *Molecular genetics of yeast: a practical approach*. IRL Press at Oxford. 1994;89:296–300.
184. Faber K, Haima P, Harder W, et al. Highly–efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* 1994;25(4):305–310.
185. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989;1:510.
186. Gonchar M, Maidan M, Pavlishko H, Sibirny A. new oxidaseperoxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol. Biotechnol.* 2001;39(8): 37–42.
187. Деркач М, Гумецкий Р, Чабан М. Курс вариационной статистики. Вища школа. 1977;96:207.
188. Leandro M, Goncalves P, Spencer-Martins I. Two glucose/xylose

transporter genes from the yeast *Candida intermedia* : first molecular characterization of a yeast xylose – H<sup>+</sup> symporter. *Biochem J.* 2006;395:543–549.

189. Aristidou A, Penttila M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000;11(36):187–198.

190. Hou J, Qiu C, Shen Y, Li H, Bao X. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose. *FEMS Yeast Res.* 2017;45(9):456–489.

191. Moysés D, Reis V, de Almeida J, de Moraes L, Torres F. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and Prospects. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):207.

192. Seo H, Liu A, Jamison T. Direct  $\beta$ -selective hydrocarboxylation of styrenes with CO<sub>2</sub> enabled by continuous flow photoredox catalysis. *J Am Chem Soc.* 2017;139(40):13969–72.

193. Richardson T, Harner N, Bajwa P, Trevors J, Lee H. Approaches to deal with toxic inhibitors during fermentation of lignocellulosic substrates. *American Chemical Society.* 2012;89:171–202.

194. Endalur G, Nair N. A semi-synthetic regulon enables rapid growth of yeast on xylose. *Nature Communications.* 2018;9:1233.

195. Wang M, Sun J, Xue F, Shang F, Wang Z, Tan T. The effect of intracellular amino acids on GSH production by high-cell density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;168:198–205.

196. Xiong Z, Guo M, Guo Y, Chu J, Zhuang Y, Zhang S. Efficient extraction of intracellular reduced glutathione from fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. *Bioresour Technol.* 2009;100:1011–1014.

197. Wang B, Liang G, Zhou Q, Xie J, Mo Y. Combined amino acids modulation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress for glutathione overproduction in *Candida utilis*. *Afr J Biotechnol.* 2010;9:5399–5406.

198. Li Y, Hugenholtz J, Sybesma W, Abee T, Molenaar D. Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;67:83–90.

199. Wang C, Zhang J, Wu H, Li Z, Ye Q. Heterologous gshF gene expression in various vector systems in *Escherichia coli* for enhanced glutathione production. *J Biotechnol.* 2015;214:63–68.

200. Rollini M, Musatti A, Manzoni M. Production of glutathione in extracellular form by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 2010;45(4):441–445.

201. Lorenz E, Schmacht M, Senz M. Evaluation of cysteine ethyl ester as efficient inducer for glutathione overproduction in *Saccharomyces spp.* *Enzyme Microb Technol.* 2016;93–94:122–131.

## СПИСОК ПУБЛІКАЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

За темою дисертації опубліковано 27 наукових робіт, серед яких 4 статті у міжнародних виданнях Scopus, 1 розділ у монографії, а також 22 тези доповідей у матеріалах конференцій, наукових з'їздів та конгресів.

1. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Ruchala J, Shevchuk N, Kuliesiene N, Khroustalyova G, Rapoport A, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast. *Microbial Cell Factories*. 2020;19(1):96.

2. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Stasyk O, Dmytruk O, Dmytruk K, Sibirny A. Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11(1):197.

3. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Fickers P, Sibirny A. Gene of the transcriptional activator *MET4* is involved in regulation of glutathione biosynthesis in the methylotrophic yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *FEMS Yeast Res*. 2018;18(2):133.

4. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Martynyuk N, Skorohod V, Sibirny A. Development of glutathione production technology based on designed active yeast overproducers. *Science and innovation*. 2015;11(5):63-65.

5. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of the efficient glutathione producers in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds: Monograph*. University of Rzeszow. 2015;11(5):323-332.

6. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. Metabolic engineering of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* for construction of the high-

temperature ethanol producers from xylose. X International Students Scientific Camp «New commercial and ecological food from Romania and Poland»; 2016 February 11-14; Oradea, Romania. P. 144

7. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Krasovska O, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. New targets for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. 6th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment”; 2016 April 21 – 22; Rzeszow, Poland. P. 66.

8. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A., Improvement of xylose alcoholic fermentation by derepression of two peroxisome localized enzymes in yeast *Hansenula polymorpha*. 6th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment”; 2016 April 21 – 22; Rzeszow, Poland. P.126.

9. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Metabolic engineering of *Hansenula (Ogataea) polymorpha* for improving high-temperature xylose alcoholic fermentation. 14<sup>th</sup> International Congress on Yeasts; 2016 September 11-15; Awaji Island, Japan. P. 256-257

10. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. The effect of derepression of two peroxisome localized enzymes on high-temperature xylose alcoholic fermentation in yeast *Hansenula polymorpha*. International Symposium on Cell Biology jointly with 5<sup>th</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology; 2016 October 2-6; Odessa, Ukraine. P. 53.

11. **Vasylyshyn R**. Engineering of the hexose transporter Hxt1 for improved utilization of xylose during high-temperature xylose alcoholic fermentation in yeast *Ogataea polymorpha*. Conference of young scientists of Institute of cell biology NAN of Ukraine; 2017 May 25; Lviv, Ukraine. P.15

12. **Vasylyshyn R**., Kurylenko O., Ruchala J., Dmytruk K., Sibirny A. Improvement of xylose utilization during high-temperature xylose alcoholic fermentation in the yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* by engineering of the



hexose transporter Hxt1. 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33); 2017 June 26-29; Cork, Ireland. P. 27.

13. Kurylenko O., **Vasylyshyn R.**, Ruchala J., Dmytruk K., Sibirny A. Studying the role of cytosolic transketolase and transaldolase in xylose metabolism and fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33); 2017 June 26-29; Cork, Ireland. P. 25.

14. Kurylenko O., **Vasylyshyn R.**, Ruchala J., Dmytruk K., Sibirny A. Studying the role of pentose phosphate pathway in xylose metabolism and fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 7th Congress of European Microbiologists; 2017 July 9-13; Valencia, Spain. P. 189-190

15. Kurylenko O, **Vasylyshyn R.**, Ruchala J, Dmytruk K, Sybirny A. Studying the role of transketolase and transaldolase with cytosolic and peroxisomal localization in the yeast *Ogataea polymorpha*. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського; 2017 вересня 11-15; Одеса, Україна. С. 48-49

16. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R.**, Dmytruk K, Sibirny A. Role of peroxisomal and cytosolic transketolase and transaldolase in xylose alcoholic fermentation in the methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. 7th International Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P. 42.

17. **Vasylyshyn R.**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sybirny A. Engineering of the hexose transporter Hxt1 for improved utilization of xylose during high-temperature xylose alcoholic fermentation in the yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. 7th International Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P. 166.

18. Shevchuk N, **Vasylyshyn R.**, Kolisnyk Y. Engineering of yeast *Ogataea polymorpha* with increased expression of modified hexose transporters. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of biology”; 2018 April 10-12; Lviv, Ukraine. P. 221-222.

19. Kurylenko O, **Vasylyshyn R.**, Bratiychuk D, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Role of oxidative and non-oxidative parts of pentose phosphate pathway in xylose

alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha*. Non-Conventional Yeasts: from basic research to application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 80.

20. **Vasylyshyn R.**, Shevchuk N, Kurylenko O, Dmytruk K, Sybirny A. Improvement of xylose alcoholic fermentation in yeast *Ogataea polymorpha* by modifications of hexose transporters Non-Conventional Yeasts: from basic research to application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 141.

21. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Shevchuk N, Daugelavičius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of the yeast *Ogataea polymorpha* with expression of the modified hexose transporters. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P. 30.

22. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. The role of pentose phosphate pathway in xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P. 28.

23. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Evaluation of transcriptional factors involved in regulation of xylose metabolism and fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine. P.65.

24. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Daugelavičius R, Dmytruk K, Sibirny A.. Engineering of the hexose transporters in the yeast *Ogataea polymorpha* for improved utilization of xylose during high-temperature alcoholic fermentation. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine. P.82.

25. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Identification of transcriptional factors involved in regulation of xylose fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 8th International Weigl Conference: Human Welfare and Infectious Diseases in a New Microbiome Research Area. Microorganisms in industrial and medical biotechnology; 2019 June 26-28; Lodz, Poland. P.98.

26. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Shevchuk N, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of hexose transporters in the yeast *Ogataea polymorpha* for improved utilization of xylose. 8th International Weigl Conference: Human Welfare and Infectious Diseases in a New Microbiome Research Area. Microorganisms in industrial and medical biotechnology; 2019 June 26-28; Lodz, Poland. P.136.

27. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Evaluation of transcriptional factors involved in the regulation of glucose and xylose metabolism and fermentation in yeast *Ogataea polymorpha*. 8th Congress of European Microbiologists; 2019 July 7-11; Glasgow, Scotland. P. 782.