Інститут біології клітини Національна академія наук України

Інститут біології клітини Національна академія наук України

> Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ДЗАНАЄВА ЛЮБОВ СЕРГІЇВНА

УДК576.343:582.282.232

ДИСЕРТАЦІЯ

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНІВ, ЗАЛУЧЕНИХ В РЕГУЛЯЦІЮ АЛКОГОЛЬНОЇ ФЕРМЕНТАЦІЇ КСИЛОЗИ У РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

091 – біологія 09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,

результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_Л. С. Дзанаєва

Науковий керівник: Дмитрук Костянтин Васильович, доктор біологічних наук,

ст.н.сп.

Львів — 2021

АНОТАЦІЯ

Дзанаєва Л.С. Ідентифікація генів, залучених в регуляцію алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних штамів *Saccharomyces cerevisiae*. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософських наук за спеціальністю 091 «біологія». - Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2021.

Дисертація присвячена дослідженням у галузі генетичної інженерії дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, спрямованим на підвищення ефективності алкогольної ферментації ксилози.

Інтенсивне використання нафтопродуктів зумовлює коливання цін на цей енергоносій, та зростання екологчних проблем. Тому одним з основних ефективної пріоритетів сьогодення розробка технології £ отримання альтернативних джерел енергії. На ринку біопалив саме етанол отриманий з лігноцелюлозних залишків сільського господарства найбільш вважається перспективним.

На сьогоднішній день біопаливна галузь базується на виробництві етанолу шляхом переробки цукрової тростини, цукрового буряка та злакових (пшениці та кукурудзи). Однак, цей так званий етанол першого покоління, вироблений із крохмалю та цукру, конкурує за джерело отримання із харчовою та кормовою промисловістю. Більш того, вирощування харчових культур відбувається із використанням гербіцидів, посилюючи негативний вплив на довкілля. Використання лігноцелюлозної біомаси для виробництва етанолу другого покоління має стратегічне значення, оскільки це найбільш поширений поновлювальний ресурс на планеті, який не має альтернативного призначення.

Крім екологічних переваг етанолу на основі лігноцелюлози її переробка надасть можливість знизити безробіття населення у сільській місцевості.

До складу гідролізатів лігноцелюлози входять два основні цукри: глюкоза, яка зброджується в першу чергу, та ксилоза. Конверсія цієї пентози до етанолу на сьогоднішній день залишається недостатньо ефективною серед мікроорганізмів. До ксилозо-ферментуючих дріжджів належать Scheffersomyces (Pichia) stipitis, Spathaspora passalidarum, Pachysolen tannophilus, Ogataea (Hansenula) polymorpha та ін. Більшість природних штамів дріжджів Saccharomyces cerevisiae не здатні не тільки ферментувати, але й рости на середовищі з ксилозою. Проте пекарські дріжджі ефективно зброджують гексози (вихід етанолу наближається до теоретичного максимуму, що становить 0,51 г/г глюкози), та характеризуються підвищеною стійкістю до екстремальних, промислових умов ферментації, зокрема за осмотолерантністю, стійкістю до високих концентрацій етанолу та низьких значень pH. З метою конструювання ксилозо-ферментуючих дріжджів S. cerevisiae було здійснено ряд підходів, проте існуючі рекомбінантні штами потребують додаткового вдосконалення. Ідентифікація нових генів, які можуть бути мішенями у регуляції алкогольної ферментації ксилози з метою подальшої їх інженерії є актуальним завданням.

Нещодавно виявлено, в регуляцію процесу алкогольної ферментації ксилози у O. polymorpha залучені пероксисомні ферменти дигідроксиацетонсинтаза та трансальдолаза. Дотепер роль пероксисом y ферментації ксилози y рекомбінантних ксилозо-утилізуючих дріжджів S. cerevisiae не вивчалася. Також немає відомостей про участь транскрипційних факторів у регуляції метаболізму ксилози у рекомбінантних штамів S. cerevisiae. У дисертаційній роботі охарактеризовано нові механізми регуляції алкогольної встановлено та ферментації ксилози у рекомбінантних штамів S. cerevisiae. За допомогою застосованих генно-інженерних методів поліпшено ефективність ферментації цієї пентози. З метою конструювання ксилозо-утилізуючих дріжджів у геном S. cerevisiae CEN.PK 113-7D було введено гени, які кодують ферменти початкових

етапів катаболізму ксилози: XYL1; XYL2, що кодують ферменти ксилозоредуктазу та ксилітолдегідрогеназу, а також XYL3, що кодує ксилулокіназу S. stipitis. Ізольований штам GS010, здатний до ферментації ксилози, був використаний у нашій роботі як вихідний.

Для візуалізації пероксисом *S. cerevisiae* GS010 при алкогольній ферментації використано зелений флуоресцентний білок (GFP) із сигнальною послідовністю доставки до пероксисом PTS (peroxisomal targeting signal). За допомогою флуориметричного та флуоресцентного аналізів показано, що пероксисоми довше зберігалися під час ферментації ксилози ніж на глюкозі. З метою дослідження ролі не окремих пероксисомних ферментів а цілих цих органел здійснено делецію гена *PEX3*, що кодує пероксисомний мембранний білок. Одержаний мутант *pex3* Δ характеризувався вираженим фенотипом, який полягав у повній відсутності пероксисом, та цитоплазматичній локалізації пероксисомних ферментів, де згодом відбувається їх інактивація та деградація. Вперше було показано, що дефіцит пероксисом призводить до зниження накопичення етанолу з ксилози штамом *pex3* Δ в 1,5 раза порівняно з вихідним штамом.

Активні форми кисню, (АФК) зокрема пероксид водню, утворюються та катаболізуються в мітохондріях та пероксисомах. Досліджено рівень АФК в клітинах штаму GS010 під час ферментації глюкози та ксилози, та показано що катаболізм ксилози супряжений з генерацією підвищеної кількості АФК. При ферментації саме ксилози зафіксовано у 1,7-1,8 раза вищий рівень АФК. Збільшення внутрішньоклітинного рівня АФК на ксилозі та зниження продукції етанолу штамом *pex3*Л привернули нашу увагу до пероксисомних ферментів, які залучені y детоксикацію пероксиду водню. Вперше встановлено роль пероксисомної каталази Ctal в процесі алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантного штаму S. cerevisiae. Делеція гена CTA1 призводила до обмеження приросту біомаси та зниження продукції етанолу в 2 рази при порівнянні з вихідним штамом. За рахунок активності цитозольної ізоформи активність каталази у штамі *cta1* була у 6 разів нижчою порівняно з

реципієнтним штамом. У *pex3*∆ мутанта пероксисомна каталаза імовірно міслокалізована і не здатна до детоксикації вільних радикалів, зокрема пероксиду водню, генерованого під час ферментації ксилози.

Встановлено, що посилення експресії гена *PEX34*, що кодує пероксисомний інтегральний мембранний білок, приводить до формування пероксисом більшого розміру та підвищує в 1,4 раза продукцію етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації. Такий вплив може бути пов'язаний з більш ефективною детоксикацією пероксиду водню, однак інші механізми, що приводять до поліпшення продукції етанолу з ксилози не виключені.

Під час виконання даної роботи на основі ксилозо-ферментуючого штаму *S. cerevisiae* сконструйовано колекцію штамів з делецією та посиленою експресією низки генів *ADR1*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1* та *ZNF1*, що кодують транскрипційні фактори та досліджено їх вплив на алкогольну ферментацю ксилози. Транскрипційний фактор Znf1 *S. cerevisiae* належить до родини транскрипційних активаторів цинкового кластеру та зв'язується з промоторами генів, продукти яких беруть участь у клітинному диханні, глюконеогенезі, циклі трикарбонових кислот та гліоксилатному шунті. Встановлено, що Znf1 не впливає на алкогольну ферментацію ксилози у *S. cerevisiae*, оскільки, як делеція так і посилення експресії *ZNF1* не змінювали рівень продукції етанолу при ферментації цієї пентози. Кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі деяких генів, що кодують ферменти циклу трикарбонових кислот, глюконеогенезу, пентозофосфатного шляху в умовах ферментації ксилози теж не виявив значних відмінностей в експресії.

Транскрипційний фактор цинкового кластеру Sip4, який є субстратом протеїнкінази Snf1, взаємодіє з CSREs (cell type-specific regulatory elements) елементами і є активатором генів, що кодують ферменти глюконеогенезу. Для з'ясування потенційної регуляторної ролі *SIP4* у метаболізмі ксилози було сконструйовано штами з делецією та посиленою експресією цього гена. Продукція етанолу надекспресуючим штамом SIP4 була знижена більш ніж

вдвічі, порівняно з батьківським, і становила 2,8 г/л. За результатами кількісного ПЛР-аналізу у реальному часі встановлено, що посилення експресії гена *SIP4*, на противагу до *sip4* Δ , значно (у 3,23 раза) підвищило експресію гена *FBP1* (кодує фруктозо1,6-бісфосфатазу), що опосередковано вказує на підвищення активності глюконеогенезу. Тому імовірно, що інтермедіати гліколізу - фруктозо-6-фосфат та гліцеральдегід 3-фосфат, утворені у реакціях неокисної ланки ПФШ, перетворюються до глюкози. Отримані результати узгоджуються із зниженням продукції етанолу при алкогольній ферментації ксилози у штамів *sip4* Δ та SIP4.

Транскрипційні регулятори Adr1 та Cat8 залежать від Snf1-опосередкованої індукції та здійснюють дерепресію низки генів, залучених у глюконеогенез та β -окислення. Adr1 є позитивним регулятором транскрипції генів, що кодують пероксисомні білки. Встановлено, що як делеція так і посилена експресія *ADR1* призводили до зниження продукції етанолу з ксилози, що становила 4,3 г/л для *adr1* Δ та 4,25 г/л для ADR1, тоді як вихідний штам GS010 продукував 5,85 г/л етанолу. Не виявлено суттєвих відмінностей у експресії більшості аналізованих генів: *ICL1*, *ACO1*, *CIT1*, *FUM1*, *MDH1*, *ADH1*, *PDC1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* та *RPE1* у штаму *adr1* Δ під час ферментації ксилози.

S. cerevisiae Cat8 - це активатор транскрипції цинкового кластера, який регулює експресію генів, що беруть участь в глюконеогенезі, утилізації етанолу, та диауксичному переході від ферментації до дихання. Одержаний мутант cat8 Δ демонстрував підвищення продукції етанолу з ксилози на 9,5% порівняно із батьківським штамом. Посилення експресії *CAT8* напроти, призвело до зниження продукції етанолу на 7,3% порівняно з вихідним штамом GS010.

Транскрипційний фактор Asg1 теж належить до родини цинкового кластеру та ϵ регулятором генів кількох метаболічних шляхів: β -окислення, гліоксилатного циклу, глюконеогенезу, та імпорту довго-ланцюгових жирних кислот до пероксисом. Делеція *ASG1* у штамі GS010 призвела до зниження продукції етанолу з ксилози у 1,23 раза.

Tup1 - загальний репресор транскрипції, утворює комплекс з Сус8, бере участь у створенні репресивної структури хроматину через взаємодію з гістонами H3 та H4. Делеція *TUP1* у штамі GS010 спричинила зниження накопичення біомаси в 4 раза у рідкому середовищі з ксилозою в аеробних умовах, а при ферментації цієї пентози продукція етанолу була нижчою в 1,58 раза. Продукція етанолу з глюкози була нижчою в 1,26 раза.

У *S. cerevisiae* ідентифіковано транскрипційний активатор Нар4, що відіграє ключову роль у контролі експресії генів мітохондріального дихання. Встановлено, що ген *HAP4* залучений в регуляцію алкогольної ферментації ксилози у штаму GS010. Виявлено, що делеція *HAP4* суттєво поліпшує продукцію етанолу при ферментації ксилози. Мутант продукує 10,4 г/л етанолу, при цьому вихід етанолу сягає 0,414 г/г ксилози. Натомість посилення експресії *HAP4* призводило до зниження продукції етанолу при ферментації ксилози. У надекспресуючому штамі HAP4 виявлено зростання експресії гена *FBP1* більше ніж в 2 рази. Делеція *HAP4* призводила до зниження рівня експресії генів ЦТК: *FUM1* (у 5 разів), *MDH1* (у 2,5 раза), *CIT1* (у 2,2 раза), та одного із генів гліоксилатного циклу *ICL1* (у 3,8 раза).

У результаті роботи ідентифіковано нові мішені для створення продуцентів паливного етанолу на основі ксилозо-ферментуючих штамів дріжджів *S. cerevisiae*. Вперше показано залучення пероксисом у регуляцію процесу ферментації ксилози *S. cerevisiae*. Виявлено, що делеція гена *HAP4* суттєво поліпшує продукцію етанолу при ферментації ксилози. Застосовані у роботі генно-інженерні підходи можуть бути екстрапольовані на інші перспективні дріжджові продуценти паливного етанолу. Сконструйовані штами можуть слугувати основою для подальших генно-інженерних маніпуляцій.

Ключові слова: етанол, ксилоза, лігноцелюлоза, метаболічна інженерія, дріжджі, *Saccharomyces cerevisiae*, пероксисоми, ідентифікація генів, транскрипційні фактори.

SUMMARY

Dzanaeva L. S. Identification of genes involved in the regulation of alcoholic fermentation of xylose in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for PhD degree in Biology (specialty 091 "biology"). - Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2021.

The thesis is devoted to the research in the field of genetic engineering of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, aimed at increasing the efficiency of xylose alcoholic fermentation.

Intensive use of petroleum products causes fluctuations in prices for this energy source and the growth of environmental problems. Therefore, one of the main priorities today is to develop efficient technology for alternative energy sources. In the biofuel market, ethanol derived from lignocellulosic agricultural residues considered to be the most promising.

Today, the biofuel industry is based on ethanol production by processing sugar cane and cereals (wheat and corn). However, this so-called first-generation ethanol, made from starch and sugar, competes with the food and feed industries. Moreover, food crops are grown using herbicides, increasing the negative impact on the environment. The use of lignocellulosic biomass for second-generation ethanol production has strategic importance because it is the most common renewable resource on the planet, which has no alternative use. Besides the environmental benefits of lignocellulose-based ethanol, its processing will provide an opportunity to reduce unemployment in rural areas.

The composition of lignocellulose hydrolysates includes two main sugars: glucose, which ferments first, and xylose. The conversion of this pentose to ethanol today remains ineffective among microorganisms. Xylose-fermenting yeasts involve

Scheffersomyces (Pichia) stipitis, Spathaspora passalidarum, Pachysolen tannophilus, Ogataea (Hansenula) polymorpha, and other. Natural Saccharomyces cerevisiae strains are not only able to ferment but also to grow on a medium with xylose. However, baker's yeast effectively ferments hexoses (ethanol yield approaches the theoretical maximum of 0,51 g/g) and is characterized by increased resistance to extreme, industrial fermentation conditions, including osmotolerance, resistance to high concentrations of ethanol and low pH values. A number of approaches have been taken to construct xylose-fermentable yeast *S. cerevisiae*, but existing recombinant strains need further improvement. Identification of new genes that may be targets in the regulation of alcoholic fermentation of xylose for further engineering is an urgent task.

To date, the role of peroxisomes in xylose fermentation in recombinant xylosefermenting *S. cerevisiae* yeast has not been studied. There is also no information on the influence of transcription factors in the xylose metabolism regulation in recombinant xylose-utilizing *S. cerevisiae* strains. In the dissertation work new mechanisms of regulation of alcoholic fermentation of xylose in recombinant strains *S. cerevisiae* are presented. The efficiency of fermentation of this pentose in yeast producers of ethanol has been improved by means of applied genetic engineering methods. In order to design xylose-utilizing yeast in the genome of *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D were introduced genes encoding enzymes of the initial stages of xylose conversion: *XYL1*; *XYL2*, which encode xylose reductase and xylitol dehydrogenase, and *XYL3*, which encodes xylulokinase of *S. stipitis*. The GS010 strain was used in our work as a source.

Green fluorescent protein (GFP) with PTS (peroxisomal targeting signals) peroxisome delivery sequence was used to visualize *S. cerevisiae* GS010 peroxisomes during alcoholic fermentation. Fluorimetric and fluorescence analyzes showed that peroxisomes persisted longer during xylose fermentation than on glucose. To study the role not just individual peroxisomal enzymes but whole organelles, deletion of the *PEX3* gene encoding a peroxisomal membrane protein was performed. The resulting *pex3* Δ mutant was characterized by a pronounced phenotype, which consisted of a complete absence of peroxisomes, and cytoplasmic localization of peroxisomal

enzymes, where their subsequent inactivation and degradation occur. For the first time it was shown that peroxisome deficiency leads to a decrease in the accumulation of ethanol from xylose in strain *pex3* Δ for 1,5 times as compared to the original strain.

ROS, ncluding hydrogen peroxide, are formed and catabolized in mitochondria and peroxisomes. The ROS level in GS010 strain cells during glucose and xylose fermentation was studied, and it was shown that xylose is more actively involved in the generation of ROS. Namely, 1,7-1,8 times higher ROS levels were recorded during the fermentation of xylose. The intracellular increase in ROS levels on xylose and its decrease during ethanol production by the *pex3* Δ strain has drawn our attention to peroxisomal enzymes that are involved in the detoxification of hydrogen peroxide. For the first time, the role of peroxisomal catalase in the process of alcoholic fermentation of xylose in a recombinant strain of *S. cerevisiae* was revealed. The *CTA1* gene deletion led to a limitation of biomass growth and a 2 fold decrease in ethanol production compared to the original strain. The catalase activity in the *cta1* Δ strain was 6 times lower compared to the recipient strain. In the *pex3* Δ mutant, Cta1 is incorrectly localized and unable to detoxify free radicals, in particular hydrogen peroxide generated during xylose fermentation.

It was found that the overexpression of the *PEX34* gene, encoding a peroxisomal integral membrane protein, leads to the formation of larger peroxisomes and increases by 1,4 times the ethanol accumulation level from xylose under alcoholic fermentation conditions. This effect may be associated with more effective detoxification of hydrogen peroxide, but other mechanisms that lead to improved ethanol production from xylose are not excluded.

During this work, a collection of strains with deletion and enhanced expression of *ADR1*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1*, and *ZNF1* genes encoding transcription factors was constructed based on the xylose-fermenting strain of *S. cerevisiae* and the mechanisms of regulation of alcoholic fermentation of xylose in the constructed strains were investigated. The transcription factor Znf1 *S. cerevisiae* belongs to the family of transcriptional activators of the zinc cluster and binds to the promoters of the genes

whose products are involved in cellular respiration, gluconeogenesis, the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. It was found that Znf1 does not affect the alcoholic fermentation of xylose in *S. cerevisiae*, since both *ZNF1* deletion and overexpression did not alter ethanol production during fermentation of this pentose. Real-time quantitative PCR analysis of some genes encoding tricarboxylic acid cycle enzymes, gluconeogenesis, PPP under conditions of xylose fermentation also did not reveal significant differences in the expression of target genes.

The transcription factor of the zinc cluster Sip4 is a substrate of the protein kinase Snf1, and interacts with CSREs elements and is an activator of genes encoding enzymes of gluconeogenesis. To clarify the regulatory role of SIP4 in xylose metabolism, strains with deletion and enhanced expression of this gene were constructed. The production of ethanol by strain SIP4 was reduced more than twice compared to the parent strain and reached 2,8 g/l. According to the results of quantitative real-time PCR analysis, it was found that overexpression of the *SIP4* gene, in contrast to *sip4* Δ , significantly increased the expression of *FBP1* (3,23 fold), indicating increase in gluconeogenic activity. Therefore, it is probable that the intermediates of glycolysis - fructose-6-phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate, formed in the reactions of the non-oxidative unit of PPP, are predominantly converted to glucose. The obtained results are in good agreement with the decrease in ethanol production during alcoholic fermentation of xylose.

Adr1 is a positive regulator of transcription of the genes encoding peroxisomal proteins. Adr1 and Cat8 are transcriptional regulators that depend on Snf1-mediated induction and derepress a number of genes involved in gluconeogenesis and β -oxidation. We found that both deletion and overexpression of *ADR1* led to a decrease in ethanol production from xylose, which was 4,3 g/l for *adr1* and 4,25 g/l for ADR1, whereas strain GS010 showed 5,85 g/l of ethanol. No significant differences were found in the expression of most of the analyzed genes in *adr1* during xylose fermentation relative to its parental strain.

S. cerevisiae Cat8 is a Zn-cluster transcriptional activator necessary for expression of the genes involved in gluconeogenesis, ethanol utilization and diauxic shift from

fermentation to respiration. The obtained $cat8\Delta$ mutant showed an increase in ethanol production from xylose by 9,5% compared to the parental strain GS010. Overexpression of *CAT8*, in contrast, led to a decrease in ethanol production by 7,3%.

The transcription factor Asg1 also belongs to the Zn-cluster family and is a regulator of the genes of several metabolic pathways: β -oxidation, glyoxylate cycle, gluconeogenesis, and import of long-chain fatty acids to peroxisomes. Deletion of *ASG1* led to a decrease in ethanol production from xylose by 1,23 times.

Transcriptional repressor Tup1 forming a complex with Cyc8p, is involved in the creation of the repressive structure of chromatin through interaction with histones H3 and H4. Deletion of *TUP1* caused a 4 fold decrease in biomass accumulation in liquid medium with xylose under aerobic conditions, and ethanol production was 1,58 times lower during the fermentation of this pentose. Ethanol production from glucose was 1,26 times lower.

In *S. cerevisiae* transcriptional activator Hap4 was identified, which plays a key role in controlling mitochondrial respiration gene expression. The involvement of the *HAP4* gene in the regulation of alcoholic fermentation of xylose has been established. Deletion of *HAP4* was found to significantly improve ethanol production during xylose fermentation. The mutant produces 10,4 g/l of ethanol, while the yield of ethanol reaches 0,414 g/g. Instead, increased expression of *HAP4* led to the opposite effect, namely a decrease in ethanol production during xylose fermentation. In the HAP4 strain we revealed an increase in *FBP1* gene expression by more than 2 times. Deletion of *HAP4* led to a decrease in the expression of TCA (tricarboxylic acid cycle) genes: *FUM1* (5 times), *MDH1* (2,5 times), *CIT1* (2,2 times), and one of the genes of the glyoxylate cycle *ICL1* (3,8 times).

As a result, new targets were identified to construct fuel ethanol producers based on xylose-fermenting *S. cerevisiae* yeast strains. The involvement of peroxisomes in the xylose fermentation process of *S. cerevisiae* has been shown for the first time. Deletion of the *HAP4* gene was found to significantly improve ethanol production during xylose fermentation. The genetically engineered approaches used in the work can be

extrapolated to other promising yeast producers of fuel ethanol. The engineered strains can serve as a basis for further genetic engineering manipulations.

Key words: ethanol, xylose, lignocellulose, metabolic engineering, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, peroxisomes, gene identification, transcription factors.

Список публікацій здобувача:

За темою дисертації опубліковано 9 наукових робіт, серед яких 3 статті у рецензованих журналах, та 6 тез доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких були апробовані результати дисертації.

1. **Dzanaeva L**, Kruk B, Ruchala J, Nielsen J, Sibirny A, Dmytruk K. The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*. (2020). *Cell Biology International*. <u>doi:10.1002/cbin.11353</u>

2. **Dzanaeva L**, Ruchala J, Sibirny A, Dmytruk K. The impact of transcriptional factors Znf1 and Sip4 on xylose alcoholic fermentation in recombinant strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (2020). *Cytology and Genetics*. Vol.54, No.5, pp. 386-392. doi:10.3103/S0095452720050035

3. **Dzanaieva L. S.**, Dmytruk K. V., Sibirny A. A. Transcriptional factor Cat8 is involved in regulation of xylose fermentation in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Фактори експерементальної еволюції організмів*. (2018). Т. 22. С. 329-334. <u>https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.970</u>

4. **Dzanaieva L.S**, Kurylenko O.O, Dmytruk K.V, Sibirny A.A Construction of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strains capable of converting xylose into ethanol, 7th International Weigl Conference, September 26-29, Lviv, Ukraine, Book of Abstracts. – 2017.

5. **Dzanaieva L**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strains able to xylose utilization, Conference of young scientists of Institute of Cell biology; Lviv, Ukraine, May 25nd 2017.

6. **Dzanaieva L**, Dmytruk K, Sibirny A. "Effect of deletion of transcription factors on xylose fermentation performants of engineered *Saccharomyces cerevisiae*," Conference of young scientists of Institute of Cell biology, Lviv, Ukraine, May 31nd 2018.

7. **Dzanaieva L**, Dmytruk K, Sibirny A. "Effect of deletion of transcription factors on xylose fermentation performants of engineered *Saccharomyces cerevisiae*," Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. 2018. P 74.

8. **Dzanaieva L**, Dmytruk K, Sibirny A. The role of transcription factors in xylose fermentation of engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae* // 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. June 18-21, 2019, Yaremche, Ukraine.

9. **Dzanaieva L**, Dmytruk K, Sibirny A. The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*, Conference of young scientists of Institute of Cell Biology. – Lviv, Ukraine, May 2019.

АНОТАЦІЯ	2
SUMMARY	3
Список публікацій здобувача1	4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	9
ВСТУП	1
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ2	6
1.1. Характеристика етанолу як альтернативного виду моторного палива2	7
1.2. Характеристика лігноцелюлозної сировини для одержання етанолу другог	'O
покоління2	8
1.3. Шлях метаболізму ксилози у дріжджів та бактерій	1
1.4. Метаболічна інженерія дріжджів S. cerevisiae як потенційного продуцент	a
етанолу3	4
1.5. Фізіологічне значення та регуляція гомеостазу пероксисом у дріжджів3	7
1.5.1. Загальні властивості пероксисом у різних груп евкаріот	7
1.5.2. Роль пероксисом у дріжджів	8
1.5.3.Сортування білків опосередковане <i>PTS1</i> та <i>PTS2</i> 4	0
1.5.4. Механізм біогенезу пероксисом. Імпорт матриксних та мембранни	X
білків4	1
1.5.5. Поділ пероксисом4	3
1.6. Роль транскрипційних факторів у механізмі глюкозної репресії в	S.
cerevisiae4	5
1.7. Вплив транскрипційних факторів на алкогольну ферментацію S. cerevisia	le
	0
1.8. Підсумок	2
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	3
2.1. Матеріали досліджень5	3
2.2. Штами мікроорганізмів5	3
2.3. Вектори та праймери ПЛР	4

3MICT

2.4. Поживні середовища та умови вирощування
2.5. Біохімічні методи
2.5.1. Отримання безклітинних екстрактів
2.5.2. Визначення активності ферментів
2.5.3. Визначення рівня концентрації АФК
2.6. Основні молекулярно-генетичні методи
2.6.1. Хімічна трансформація дріжджів S. cerevisiae60
2.6.2. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів
2.6.3. Виділення плазмідної ДНК з клітин <i>Е. coli</i>
2.6.4. Умови полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ПЛР у режимі
реального часу62
2.7. Умови алкогольної ферментації дріжджів
2.8. Делеція генів ZNF1, SIP4, ADR, TUP1, ASG1, HAP4 та CAT863
2.9. Посилення експресії генів ZNF1, SIP4, ADR1 та HAP465
2.10. Визначення концентрації аналітів
2.11. Статистичний аналіз
РОЗДІЛ З. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ67
3.1. Дослідження ролі пероксисом у алкогольній ферментації ксилози у
рекомбінантного штаму S. cerevisiae GS01067
3.1.1. Конструювання штаму S. cerevisiae з посиленою експресією гена GFP-
<i>PTS1</i> 67
3.1.2. Конструювання, біохімічний аналіз та характеристика алкогольної
ферментації штаму S. cerevisiae GS010/GFP з делецією гена PEX3, що кодує
пероксисомний мембранний білок71

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- КІ ксилозоізомераза
- КДГ ксилітолдегідрогеназа
- КК ксилулокіназа
- КР ксилозоредуктаза
- FAD⁺ флавінаденіндинуклеотид
- NAD⁺ нікотинамідаденіндинуклеотид
- NADH нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
- NADP⁺ нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
- NADPH нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
- ПФШ пентозофосфатний шлях
- АФК активні форми кисню
- т.п.н. тисяч пар нуклеотидів
- ORF відкрита рамка трансляції
- ПЛР полімеразна ланцюгова реакція
- OD оптична густина
- SSF одночасна сахарифікація та ферментація
- YP поживне середовище для дріжджів (дріжджовий екстракт та пептон).
- YNB yeast nitrogen base, синтетичне середовище для дріжджів
- АО алкогольоксидаза
- ТФ транскрипційні фактори
- PTS сигнал доставки до пероксисом
- РЕХ гени біогенезу пероксисом
- ICL1 ізоцитрат ліаза
- АСО1 аконітаза
- МАЕ1 малатдекарбоксилаза
- FBP1 фруктозо1,6-бісфосфатаза

- РСК1 фосфоенолпіруват карбоксикіназа
- *CIT1* цитрат синтаза
- *FUM1* фумараза
- *MDH1* малатдегідрогеназа
- РҮС1 піруваткарбоксилаза
- ADH1 алкогольдегідрогеназа
- PDC1 піруватдекарбоксилаза
- *TAL1* трансальдолаза
- *TKL1* транскетолаза
- *RKI1* рибозо-5-фосфат ізомераза
- *RPE1* рибулозо-5-фосфат епімераза.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Викили двигунів внутрішнього згорання це небезпечні антропогенні забруднювачі, які зумовлюють зміни в екосистемах, а емісія CO₂ загострює парниковий ефект, тому з екологічних міркувань використання етанолу як палива має ряд переваг [1]. На сьогодні практично весь вироблений етанол належить до так званого "етанолу першого покоління", що вказує на тип вихідної сировини, а саме, гідролізати крохмалю та сахароза, отримані шляхом переробки харчових десятиліття В останні інтенсифікувались дослідження культур. шодо використання нехарчової поновлюваної сировини - лігноцелюлози для отримання паливного етанолу другого покоління. Проте реалізація цієї технології ускладнена комплексністю лігноцелюлозної структури. До її складу входять три основні компоненти: полімери цукрів целюлоза (30-50%), геміцелюлоза (35-45%), і ароматичний гетерополімер лігнін (15-25%). Ключовою проблемою є відсутність мікроорганізму, здатного до ефективної ферментації основних цукрів даного гетерополімеру: глюкози та ксилози. Природними ферментаторами ксилози є етанологенні кишкові бактерії (Escherichia coli, Klebsiella oxytoca), дріжджі (Ogataea (Hansenula) polymorpha, Spathaspora passalidarum, Scheffersomyces (Pichia) stipitis, Pachysolen tannophilus, Kluyveromyces marxianus та інші, а також деякі міцелійні гриби [2].

E. coli здійснює ферментацію змішаного типу, продуктами якої є практично рівні кількості етанолу, лактату, ацетату та форміату. У застосованих експериментальних підходах було одержано штами *E. coli* та *K. oxytoca*, що нагромаджують етанол як єдиний продукт ферментації гексоз і пентоз [3, 4]. Проте ферментація з використанням бактерій має суттєві недоліки, зокрема через складність їх відділення від ферментативного середовища та чутливість до фаголізису.

Серед природних штамів дріжджів, *S. stipitis* - найефективніший ферментатор ксилози (продукує 50 г/л етанолу, при цьому вихід становить 0,44 г/г ксилози),

проте даний продуцент дуже чутливий до етанолу [5]. Застосування підходів метаболічної інженерії до *O. polymorpha* дали можливість сконструювати штам, що продукує близько 16 г/л етанолу з ксилози при 45°С. Цей термотолерантний вид дріжджів є стійкішим до токсичної дії етанолу ніж S. stipitis, але чутливішим від S. cerevisiae [6, 7]. S. passalidarum, на відміну від S. stipitis та K. marxianus не зазнає репресії глюкозою, та здійснює коферментацію глюкози, целобіози та ксилози з виходом етанолу 0,42 г/г, а також продукує 39 г/л етанолу з виходом 0,37 г/г з гідролізатів листя [8]. Проте навіть у рекомбінантних ксилозоферментуючих мікроорганізмів є певні недоліки, зокрема це низька стійкість до інгібіторів лігноцелюлозних гідролізатів. Також недостатньо ефективною залишається ферментація ксилози, а її конверсія міцелійними грибами є дуже повільною.

Усталений продуцент етанолу - дріжджі *S. cerevisiae* не здійснюють ферментацію пентоз, проте цей вид характеризується стійкістю до промислових умов ферментації. Використання штамів пекарських дріжджів здатних до ферментації пентоз, дасть можливість проведення ферментації в анаеробних умовах, заощадивши кошти на аерації та подальшому охолодженні біореакторів.

Групою професора Jens Nielsen (Chalmers University of Technology, Швеція) S. cerevisiae, сконструйовано ксилозо-ферментуючий штам шо містить центромерну плазміду pRS314-X123 для посилення експресії генів XYL1; XYL2 та початкових етапів метаболізму ксилози XYL3, які кодують ферменти (ксилозоредуктазу, ксилітолдегідрогеназу ксилулокіназу), та отримані **i**3 природного ферментатора ксилози S. stipitis. На наступному етапі роботи застосовано метод еволюційної інженерії, тобто культивування з періодичним перенесенням культури у мінеральне середовище, що містило ксилозу. Ізольований штам GS010, здатний зброджувати ксилозу, було використано у цій роботі як вихідний [9].

Незважаючи на інтенсивну роботу, направлену на інженерію ксилозоферментуючих штамів *S. cerevisiae*, продукція, продуктивність та вихід етанолу з ксилози все ще залишаються нижчими, ніж для глюкози. Тому виявлення нових механізмів регуляції зброджування чужорідного субстрату - ксилози до етанолу, які можуть бути мішенями для поліпшення характеристик алкогольної ферментації цієї пентози дріжджами є актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є частиною фундаментальних досліджень відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАНУ за темою «Роль транскрипційних активаторів та репресорів в регуляції алкогольної ферментації пентоз та гексоз» (№ держреєстрації 0120U456789, 2020-2021 рр.). Робота була підтримана грантом Польського національного наукового центру (NCN) Ориз UMO-2016/21/B/NZ1/00280, а також грантами Національної академії наук України (гранти 2-19 і 31-19).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи була ідентифікація генів, залучених в регуляцію алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*.

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

- Дослідити роль пероксисом у процесі алкогольної ферментації ксилози у штамі з дефіцитом пероксисом, одержаним шляхом делеції гена *PEX3*, що кодує пероксисомний мембранний білок.
- Дослідити вплив посилення проліферації пероксисом у процесі алкогольної ферментації ксилози, шляхом надекспресії гена *PEX34*, що кодує пероксисомний інтегральний мембранний білок.
- 3. На основі ксилозо-ферментуючого штаму S. cerevisiae сконструювати колекцію штамів з делецією генів: ADR1, CAT8, ASG1, HAP4, SIP4, TUP1 та ZNF1; та посиленою експресією генів: ADR1, CAT8, HAP4, SIP4 та ZNF1, що кодують транскрипційні фактори.
- Дослідити рівень експресії залежних генів-мішеней, а саме: ICL1, ACO1, MAE1, FBP1, PCK1, CIT1, FUM1, MDH1, PYC1, ADH1, PDC1, TAL1, TKL1, RKI1 та RPE1.

5. Вивчити особливості алкогольної ферментації ксилози та глюкози у сконструйованих штамів.

Об'єкт дослідження. Алкогольна ферментація ксилози.

Предмет дослідження. Нові гени та відповідні білкові продукти, що задіяні у регуляції алкогольної ферментації ксилози.

Методи дослідження. У роботі використовували класичні генетичні, мікробіологічні, біохімічні та мікроскопічні методи досліджень. Конструювання рекомбінантних векторів здійснено з використанням молекулярно-біологічних методів роботи з ДНК, а також трансформації дріжджів та бактерій. Аналіз одержаних рекомбінантних штамів дріжджів здійснювали методом ПЛР-аналізу. Експресію генів досліджували методом ПЛР у реальному часі. Активність ферментів визначали у безклітинних екстрактах. У роботі застосовували методи спектрофотометрії, а для клітинно-біологічних досліджень флуоресцентну мікроскопію.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше висунуто гіпотезу про те, що пероксисоми беруть участь у регуляції алкогольної ферментації ксилози у S. cerevisiae. Для її підтвердження здійснено делецію гена PEX3, що кодує інтегральний мембранний білок пероксисом та показано, що відсутність цих органел призводить до зниження виходу етанолу з ксилози в 1,5 раза. Встановлено, що посилення експресії гена РЕХЗ4, що кодує пероксисомний інтегральний мембранний білок, приводить до формування пероксисом більшого розміру та підвищує в 1,4 раза продукцію етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації. виявлено пероксисомної каталази Вперше роль В процесі алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантного штаму S. cerevisiae. Делеція гена СТА1, що кодує пероксисомну каталазу призводила до обмеження приросту біомаси та зниження продукції етанолу в 2 раза у порівнянні з вихідним штамом. Встановлено, що ксилозо-ферментуючий штам S. cerevisiae генерує в 1,8 раза більшу кількість активних форм кисню при ферментації ксилози у порівнянні з глюкозою.

На основі ксилозо-ферментуючого штаму сконструйовано колекцію штамів з делецією генів: *ADR1*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1* та *ZNF1*; та посиленою експресією генів: *ADR1*, *CAT8*, *HAP4*, *SIP4* та *ZNF1*, що кодують транскрипційні фактори. Встановлено, що інгібування дихання шляхом делеції гена *HAP4* веде до зростання продукції етанолу в 1,8 раза при порівнянні з вихідним штамом та сягає 10,4 г/л етанолу при ферментації ксилози.

Практичне значення одержаних результатів. Ідентифіковано нові мішені для метаболічної інженерії рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*. За допомогою генноінженерних підходів сконструйовано рекомбінантний штам, продукція етанолу з ксилози у якого підвищена у 1,8 раза у порівнянні із вихідним штамом, та становить 10,4 г/л. Таке поліпшення параметрів ферментації дозволяє використання цього штаму у якості вихідного для подальшої метаболічної та еволюційної інженерії. Застосовані методи можуть бути екстрапольовані на інші перспективні продуценти для поліпшення алкогольної ферментації ксилози.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно, або спільно з науковим керівником д. б. н. Дмитруком К. В. визначено головні завдання дослідження, розроблено програму проведення досліджень, відібрано методи та об'єкти для розв'язання поставлених завдань. Експерементальні дослідження, результати яких представлені у даній роботі проведені дисертантом самостійно, або спільно зі співавторами публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи опубліковано у вигляді наукових статей у фахових журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей на наступних наукових конференціях: VII Міжнародній Вайглівській мікробіологічній конференції (Львів, Україна, 2017). Міжнародній конференції «Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application» (Rzeszow, Poland, 2018). Українському конгресі з клітинної біології з міжнародним представництвом (м. Яремче, Україна, 2019). Щорічних наукових конференціях для молодих науковців в Інституті біології клітини (м. Львів, Україна). Структура та обсяг дисертації. Дисертація включає розділи «Анотація», «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаної літератури». Дисертацію викладено на 159 сторінках друкованого тексту. Робота містить 50 рисунків та 7 таблиць. Список використаної літератури нараховує 243 джерела.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика етанолу як альтернативного виду моторного палива.

Серед альтернативних видів палив (біодизель, biocrude, біоетанол, біогаз, та ін.) паливний етанол з поновлювальної сировини вважається найбільш перспективним [10]. Порівняно з бензином він характеризується вищим октановим числом та вищим тиском парів. Використання саме спирту як додатку до бензину за останнє десятиліття неухильно зросло. У зв'язку з цим попитом у 2019 році світове виробництво етанолу сягнуло нового рекорду 29 млрд. гал. (≈ 110 млрд. л) (http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics).

Етанол володіє нижчою енергоємкістю на 33% порівняно з бензином внаслідок наявності атома кисню у його молекулі [11]. З іншого боку оксигенування бензину підвищує повноту його згорання, знижує вміст чадного газу та інших продуктів неповного окислення у вихлопних газах [12]. Паливо, що містить об'ємну частку етанолу 5-15% (E5-E15) (Low blend fuel) використовується у двигунах внутрішнього згорання без адаптації останніх. Для спеціалізованих двигунів Fuel Flex пропонуються суміші з вищою об'ємною часткою етанолу E85, E95 та E100 (High blend fuel) [13, 14].

Біоетанол одержують з традиційної сировини, якою є гідролізати крохмалю та цукор (сахароза), одержані шляхом переробки цукрової тростини та зернових, так званий етанол першого покоління. У провідних дослідницьких центрах світу проводиться робота спрямована на конструювання продуцентів (зокрема дріжджових) для отримання етанолу з альтернативної нехарчової сировини лігноцелюлози, та оптимізація показників ефективності технологічного процесу для зниження собівартості продукції. Масштабне комерційне виробництво паливного етанолу з цього матеріалу, що включає відходи сільського господарства, деревообробки, органічні компоненти комунальних відходів, які не мають іншого застосування досі не реалізовано.

1.2 Характеристика лігноцелюлозної сировини для одержання етанолу другого покоління.

Лігноцелюлоза набагато комплексніша за структурою порівняно з крохмалем чи сахарозою. Це пояснює те, що на даний момент не розроблено рентабельної технології для її конверсії в етанол. До складу цього гетерополімеру входять 3 основні компоненти: целюлоза (30-50%), геміцелюлоза (35-45%), лігнін (15-25%); вміст яких різниться у різних типах біомаси [15]. Целюлоза та геміцелюлоза є полімерами цукрів, продукти гідролізу яких можуть слугувати як сировина для зброджування в етанол.

Целюлоза - лінійний, стереорегулярний, гомополісахарид β-D-глюкопіранози у вигляді довгих ниток, з'єднаних β-1,4-глікозидними зв'язками, не розчинний у воді. Структурною одиницею цієї макромолекули є дисахарид целобіоза, утворений залишками β-глюкози. У складі лігноцелюлози вона формує мікрофібрили (30-50 ланцюгів разом) з кристалічними та аморфними ділянками, що оточені шарами геміцелюлози та лігніну [16]. Схематичне зображення структури лігноцелюлози подано на рис.1.1.



Рис.1.1. Схематичне зображення структури лігноцелюлози [16].

Геміцелюлози - це розгалужені гетерополімери різних цукрів: пентоз (Dксилоза, L-арабіноза), гексоз (D-галактоза, L-галактоза, D-манноза, D-глюкоза, Lрамноза, L-фукоза) та уронових кислот (головним чином D-глюкуронова кислота) [17]. Серед різних типів геміцелюлоз виявлених у клітинних стінках рослин та деяких зелених і червоних водоростей є гетерополімер – ксилан [18]. Відходи кукурудзи містять 32-37% пентозанів, які легко гідролізуються [19]. Лігнін найрозповсюдженіший нерегулярний полімер у природі, що складається з трьох ароматичних спиртів, транс-пара-кумарилового, транс-пара-коніферилового, транс-пара-синапілового та деяких ароматичних кислот [20]. Складність трансформації лігноцелюлози прямо пропорційна від кількості лігніну у клітинних стінках та міжклітинному просторі, що зумовлює міцність стовбурів і стебел рослин. Його функція - захист рослини від патогенних мікроорганізмів, і лише деякі гриби здатні розкладати лігнін [21].

Трансформація лігноцелюлозної біомаси включає три основні етапи: попередня підготовка біомаси, гідроліз целюлози, зброджування цукрів. Стадія попередньої підготовки сировини має декілька варіацій, в залежності від типу структури волокна. Матеріал подрібнюють на частинки розміром до 2 мм, з подальшим можливим використанням лугів [22], гідроксиду натрію, слабких кислот [23], іонних рідин [24, 25], індукційного нагрівання [26], обробки вапном [27]. Найбільш перспективним визнано застосування гідролізу лігноцелюлози за допомогою підвищених температур та високого тиску.

Нагрівання здійснюється гострою парою, тиск і температура підвищуються до 30-35 бар, та 190-200°С відповідно, час витримки - до 20 хв, із додатковим внесенням окисників: кисню, пероксиду водню або повітря [28]. Недоліком цього методу є не повна делігніфікація. З метою видалення лігніну на наступному етапі пропонується використання грибів *Phanerochaete chrysosporium*, які здатні до його деградації [29].

Різновидом гідролізу нагріванням при підвищеному тиску є паровий вибух в результаті якого відбувається деградація зв'язків геміцелюлози (>80%). Він

здійснюється шляхом різкого перепаду тиску від 5-35 бар до атмосферного тиску (1 бар), що супроводжується декомпресією (вибухом). Температура матеріалу становить 95-100°С, що забезпечує стерильність [30].

Обробка слабкою кислотою є процесом, що поєднує паровий вибух із додаванням каталізатора - водного розчину аміаку при 50°С. Після попередньої обробки такого типу утворюються інгібуючі сполуки: аліфатичні кислоти, похідні фурану, а також фенольні альдегіди, що вимагає застосування методів детоксикації [31]. Після попередньої обробки лігноцелюлози гідроліз може відбуватись кислотним або ферментативним шляхом. При кислотному гідролізі використовують розведену сульфатну кислоту або ж концентровану сульфатну чи хлоридну кислоти. Даний метод є більш вартісним, але в результаті утворюється менше побічних продуктів, які гальмують ріст і ферментацію мікроорганізмів (фурфурол, гідроксиметилфурфурол, феноли, оцтова та мурашина кислоти). Головним недоліком використання концентрованих кислот є хімічне забруднення оточуючого середовища [32].

Ферментативний гідроліз проводять за участю ферментів целюлозолітичного комплексу. Основними мікроорганізмами, що продукують целюлази, є гриби, збудники м'якої та бурої гнилі, а також різні види аеробних і анаеробних бактерій. До ензимів целюлазного комплексу належать ендо-1,4-β-глюканази, а також β-глюкозидази та екзоцелобіогідролази. Продуктом дії цих ферментів є дисахарид целобіоза, яка розщеплюється целобіазою до глюкози [33].

Окремий інтерес становлять термофільні продуценти, здатні синтезувати ензими, стійкі до кислих і лужних значень pH та температури до 90°С (з метою часткового поєднання з етапом попередньої обробки). Такими відомими термофілами є анаеробні бактерії *Clostridium thermocellum*, актиноміцет *Thermomonospora fusca*, а також термофільні аеробні гриби (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*) [34, 35]. Недоліками ензиматичного гідролізу є висока вартість ферментного комплексу та інгібування гідролітичних ферментів за механізмом зворотного зв'язку, тобто вивільненими моно- та олігосахаридами. Для уникнення інгібування кінцевим продуктом ферментативний гідроліз поєднують з одночасною ферментацією вивільнених цукрів до етанолу. Цей процес отримав назву «Одночасна Сахарифікація і Ферментація» або SSF, від Simultaneous Saccharification and Fermentation. SSF вимагає використання термотолерантних продуцентів етанолу, оскільки сахарификація відбувається при температурах 50-65 °C. Саме тому пошук термотолерантних штамів мікроорганізмів, здатних до алкогольної ферментації основних цукрів гідролізатів лігноцелюлози залишається актуальним завданням [36].

Практичним і економічно вигідним було б поєднання почергових процесів ферментативного оцукрювання та власне ферментації з використанням єдиного мікроорганізму лля реалізації методу консолідованої біообробки (CBP consolidated bio processing). Дріжджі S. cerevisiae не здатні ферментувати крохмалисті субстрати, тому було здійснено ряд спроб експресії глюкоамілаз (Aspergillus awamori, Rhizopus oryzae, Saccharomycopsis fibuligera, Saccharomyces diastaticus), α-амілаз (Lipomyces kononenkoae, Streptococcus bovis, Debaryomyces occidentalis) та ізоамілази Pseudomonas amvloderamosa [37]. Цільові генетичні маніпуляції проводяться ще з середини 80-х років минулого століття [38]. Рекомбінантний штам S. cerevisiae, що одночасно експресує нативний ген, який α-амілазу Talaromyces (temA), кодує emersonii та кодон-оптимізовану глюкоамілазу (temG Opt) здатний ферментувати безпосередньо сирий кукурудзяний крохмаль до етанолу. На 8 добу продукція етанолу становить 98,13 г/л, що відповідає 94% конверсії Карбону [39].

1.3 Шлях метаболізму ксилози у дріжджів та бактерій.

D-ксилоза є основною пентозою, отриманою при гідролізі геміцелюлозної фракції, та другим за кількістю моносахаридом (становить близько 30%) після глюкози. Потрібно зазначити, що на сьогодні не ідентифіковано специфічних транспортерів ксилози, транспорт відбувається за участю транспортерів глюкози.

Відомо, що у ксилозоутилізуючих дріжджів поглинання цього субстрату відбувається за участю двох транспортних систем: 1) низькоспоріднена транспортна система (система полегшеної дифузії) за градієнтом концентрації цукру в умовах його високої концентрації, 2) високоспоріднена транспортна система з використанням АТР (протонна симпортна система) [40].

Встановлено, що у *S. cerevisiae* ксилоза потрапляє в клітини через гексозні транспортери родини *HXT*, які мають в десятки разів нижчу спорідненість до ксилози, ніж до глюкози [41]. Шляхом експресії кожного з генів *HXT* у штамі з делецією 18 *HXT* генів було встановлено, що глюкозні транспортери Hxt7, Gal2, Hxt4 та Hxt5 є необхідними для транспорту ксилози, а два білки Hxt5 і Hxt7 є необхідними для транспорту ксилози як єдиного джерела Карбону [42].

Процес перетворення ксилози до ксилулози у деяких грибів та ксилозоутилізуючих дріжджів відбувається в два етапи: на першому NADPHзалежний фермент ксилозоредуктаза (XR, EC 1.1.1.307) перетворює ксилозу в ксилітол, натомість фермент другого етапу - ксилітолдегідрогеназа (XDH, EC 1.1.1.В19) потребує NAD⁺ для перетворення ксилітолу в ксилулозу. Цей так званий дисбаланс кофакторів суттєво знижує синтез етанолу, через перетворення частини ксилози у ксиліт, що виділяється у середовище [43].

У бактерій та деяких грибів наявний ізомеризуючий шлях, що реалізується ферментом ксилозоізомеразою (КІ, ЕС 5.3.1.5), який безпосередньо перетворює ксилозу до ксилулози оминаючи етап формування ксиліту. У завершальній реакції фермент ксилулокіназа (ХК, ЕС 2.7.1.17) фосфорилює ксилулозу з утворенням ксилулозо-5-фосфату, що потрапляє у пентозофосфатний шлях [44].

У наступних чотирьох оборотних реакціях неокиснювальної ланки ПФШ, що каталізуються трансальдолазою (TAL, EC 2.2.1.2), транскетолазою (TKL, EC 2.2.1.1), рибулозо-5-фосфатепімеразою (RPE, EC 5.1.3.1) та рибозо-5-фосфат кетоізомеразою (RKI, EC 5.3.1.6) утворюються фосфорильовані цукри. Фруктозо-6фосфат та гліцеральдегід-3-фосфат перетворюються у гліколітичному шляху до

пірувату. Схематичне зображення шляху метаболізму ксилози у дріжджів та бактерій подано на рис.1.2.



Рис. 1.2. Шлях метаболізму ксилози у дріжджів та бактерій [44].

КР - ксилозоредуктаза, КДГ - ксилітолдегідрогеназа, КІ - ксилозоізомераза, КК - ксилулокіназа, АрДГ - арабінітолдегідрогеназа, РР - рибулозоредуктаза, РК - рибулокіназа, ГЗФДГ - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа.

Піруват є ключовою молекулою у декількох метаболічних шляхах, зокрема слугує вихідною речовиною для глюконеогенезу - процесу зворотного до гліколізу. За аеробних умов піруват окиснюється до ацетил-коферменту А, який вступає в цикл Кребса, а в умовах нестачі кисню перетворюється у ацетальдегід, який відновлюється до етанолу [44]. Нижче ми коротко узагальнюємо дані щодо метаболічної інженерії різних етапів метаболізму ксилози дріжджів *S. cerevisiae*, використаних як експериментальна модель у цій роботі.

1.4 Метаболічна інженерія дріжджів *S. cerevisiae* як потенційного продуцента етанолу.

Продукція етанолу з глюкози штамами *S. cerevisiae* є наближеною до теоретичного максимуму (0,51 г/г глюкози), хоча на практиці через синтез невеликих кількостей гліцерину та ацетату цей показник є нижчим. Ферментація відбувається в анаеробних умовах, дозволяючи заощадити кошти на додатковій аерації і подальшому охолодженні біореактора, що робить цей організм перспективним і затребуваним у даному напрямку. Для розробки ефективної технології виробництва етанолу другого покоління було успішно використано різноманітні стратегії.

У більш ранніх роботах описана надекспресія двох власних генів: *GRE3*, що кодує неспецифічну альдозоредуктазу, та *XYL2*, що кодує ксилітолдегідрогеназу. Це обумовило здатність *S. cerevisiae* повільно рости на середовищі з ксилозою в присутності глюкози за аеробних умов, генеруючи великі кількості ксиліту [45]. Експресія гетерологічних *XYL1*, що кодує ксилозоредуктазу, і *XYL2 S. stipitis* підвищувала вихід етанолу вдвічі [46].

Проведено серію робіт із використанням методів білкової інженерії для зміни спорідненості КР і КДГ *S. cerevisiae* до їхніх кофакторів [47]. Ще одним із підходів, за допомогою якого вдалося збільшити вихід етанолу на 60% у *S. cerevisiae* за рахунок встановлення оксисно-відновного балансу, була експресія глюкосомальної NADH-залежної фумарат редуктази (FRD, EC 1.3.1.6) з паразитичного кінетопластиду *Trypanosoma brucei* [48].

Здійснено численні спроби до надекспресії КІ, зокрема ниткоподібного актиноміцету Actioplanes missouriensis, та бактерій: Clostridium thermosulphurogenes, Bacillus subtilis, xylA Escherichia coli, Streptomyces rubiginosus, що призводило до утворення нерозчинного білка, який був каталітично неактивним [49]. Неефективні спроби експресії прокаріотичних КІ в дріжджах пояснюються посттрансляційними модифікаціями, формуванням інтер-

або інтрамолекулярних дисульфідних містків, іншим рівнем pH у дріжджовій клітині [50].

Внаслідок експресії КІ термофільної бактерії *Thermus thermophilus* втричі покращено утилізацію ксилози, проте продукція етанолу залишалась на низькому рівні, оскільки проявлялась різниця в оптимумах температури для росту дріжджів (30° C) та активності фермента (85° C). Подвійний негативний ефект від акумуляції ксиліту проявляється по-перше: через відтік Карбону, який потенційно міг би перетворитись до етанолу, і по-друге: кисліт конкурентно інгібує КІ [51]. Тому на основі попереднью сконструйованого штаму, здійснено додатково делецію *GRE3* (КР), *S. cerevisiae*, що відновлює ксилозу до ксиліту, а також надекспресовано ендогенну КК [52]. Успішно експресовано КІ із анаеробних целюлолітичних грибів виду *Piromyces* sp. E2, активність ферменту при температурі 30° С становила 0,3–1,1 МО/мг білка. Адаптований еволюційною селекцією штам виявляв покращений ріст в середовищі з ксилозою [53].

Внаслідок інтеграції оптимізованого гена КІ бактерії *Burkholderia cenocepacia* отримано рекомбінантні штами, що не нагромаджували ксиліт в анаеробних умовах, та характеризувались збільшеним споживанням ксилози у 5 разів, та продукцією етанолу у 1,5 раза [54]. У результаті експресії КІ целюлолітичної бактерії *Clostridium cellulovorans*, отримано штам *S. cerevisiae*, відповідний фермент якого був представлений на зовнішній поверхні клітинної стінки. Штам проявляв хороший ріст у середовищі з ксилозою, та вищий вихід етанолу в анаеробних умовах [55].

У ксилозо-ферментуючих дріжджів у середовищі з ксилозою відбувається 20кратна індукція КК, проте активність КК *P. tannophilus* і *C. shehatae* є на порядок вищою ніж у *S.cerevisiae*. Для виявлення фізіологічної ролі гена *XKS1*, що кодує ксилулокіназу *S.cerevisiae*, було здійснено його делецію. Мутант був не здатний до росту на ксилулозі, проте надекспресія *XKS1* в делеційному штамі покращувала ріст порівняно з диким типом. Мутантні штами *S. stipitis* з делецією КК погано ростуть і абсолютно не продукують етанол з ксилози, проте утворюють значну кількість ксиліту. Відомо, що цей організм володіє альтернативним шляхом з відновленням арабінітолу до рибулози, фосфорильований продукт якої потрапляє у ПФШ (рис.1.2) [56].

З метою конструювання ксилозо-утилізуючих дріжджів у дикий штам *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D введено центромерну плазміду pRS314-X123 для посилення експресії генів *XYL1*; *XYL2* та *XYL3*, отримані із природного ферментатора ксилози *S. stipitis*. Рекомбінантний штам був підданий еволюційній інженерії, тобто декільком повторюваним циклам культивування з періодичним переносом культури у мінеральне середовище, що містило ксилозу. Ізольований штам GS010 характеризувався швидким ростом на ксилозі та швидким споживанням цього субстрату. Даний штам був використаний у нашій роботі як вихідний [9]. Також використовуючи штам *S. cerevisiae* з посиленою експресією KI *Piromyces sp.* E2 було здійснено додаткову надекспресію KK, делецію гена *GRE3*, а також чотирьох генів, що кодують ферменти ПФШ: *RPE1*, *RKI1*, *TAL1*, *TKL1*, що значно поліпшило ріст і характеристики алкогольної ферментації ксилози в анаеробних умовах [57].

Застосовуючи систему CRISPR-Cas9 на основі S. cerevisiae BY4741 посилено експресію генів, залучених у ПФШ: xylA*3 (бактерійний ген, що кодує TAL1. XKS1. ксилозоізомеразу), gre3 Δ . pho13 (*PHO13* кодує nнітрофенілфосфатазу, субстратом цього ферменту є ксилулозо-5-фосфат, дефосфорилювання якого веде до зниження продукції етанолу з ксилози). Після здійснення еволюційної інженерії отримано штам, який характеризувався високим рівнем спільної конверсії цукрів [58, 59]. У подальшій роботі він був реципієнтом для інтеграції ще однієї копії гена xylA*3, а також RPE1, та asc1Δ (ASC1 кодує компонент малої (40S) рибосомної субодиниці, інгібітор трансляції, контролює фосфорилювання багатьох білків) в комбінації з еволюційною інженерією, вихід етанолу з ксилози становив 0,46 г/г, а у суміші з глюкозою 0,48 г/г при 35°С [60].
1.5 Фізіологічне значення та регуляція гомеостазу пероксисом у дріжджів.

1.5.1 Загальні властивості пероксисом у різних груп евкаріот.

Пероксисоми - це одномембранні органели, які не містять ДНК та присутні майже у всіх евкаріотичних клітинах. Відомі лишень декілька виключень, а саме протисти *Giardia* та *Entamoeba*, а також паразитичні одноклітинні гриби *Microsporidia*, які не містять пероксисом та мітохондрій. Протисти, що містять мітохондрії належать до типу *Apicomplexa*, який включає більше 5 тис. видів, серед яких збудники хворіб людей та тварин [61, 62, 63].

Пероксисоми містять оксидазу, що утворює пероксид водню і детоксикаційний фермент каталазу, що каталізує його розклад. β -окислення жирних кислот є важливою функціональною характеристикою більшості евкаріотичних пероксисом від дріжджів до людини. У тварин пероксисоми додатково беруть участь в окисній деградації довголанцюгових жирних кислот, пуринів, деяких амінокислот, піпеколінової кислоти, а також у синтезі холестеролу, жовчних кислот та ефірних ліпідів, таких як плазмалогени. У ссавців пероксисоми присутні у всіх клітинах крім еритроцитів та сперматозоїдів, найбільша їх кількість у гепатоцитах (близько 2% від загального білка) [64, 65, 66].

Пероксисоми рослин класифікуються на три групи: гліоксисоми, пероксисоми листя та неспеціалізовані пероксисоми. Всі вони містять каталазу, однак разюче відрізняються іншими ознаками. Гліоксисоми беруть участь переважно в гліоксилатному циклі та β -окисленні жирних кислот, зокрема при проростанні насіння отримані вуглеводи використовуються на енергетичні потреби. Тоді як пероксисоми листя відіграють певну роль у метаболізмі гліколевої кислоти, а також беруть участь у метаболізмі побічних продуктів фотосинтезу (фото диханні) [67]. У пероксисомах тварин та грибів є близько 50 білків та близько 100 білків у пероксисомах рослин [68]. У *S. cerevisiae* ідентифіковано щонайменше 66 пероксисомних білків [69].

У деяких міцеліальних грибів є спеціалізовані пероксисоми, відомі як тільця Вороніна. Вважається, що їх основною функцією є попередження втрати цитоплазми при пошкодженні гіфи [65]. У грибів пероксисоми беруть участь у катаболізмі незвичних джерел Карбону і азоту (метанолу, пуринів, D-амінокислот, піпеколінової кислоти, спермідину, саркозину, гліколату та ін), а також лізину у дріжджів [70, 71, 72]. Відомо теж що декілька реакцій біосинтезу пеніциліну у міцеліальних грибів локалізовані в пероксисомах [73]. У рослин та міцеліальних грибів одна із реакцій біосинтезу біотину відбувається у пероксисомах [74, 75]. У деяких паразитичних протистів (*Kinetoplastida*), а саме родів *Trypanosoma* і *Leishmania* пероксисоми містять основні реакції гліколізу і відомі як глікосоми. Така компартменталізація гліколітичних ферментів необхідна для виживання цих простіших [76].

У людей спостерігаються орфанні хвороби біогенезу пероксисом (Peroxisomal Biogenesis Disorders (PBD). Дефіцит цих органел призводить до захворювання людини - синдрому Зельвегера. Встановлено, що клітини таких пацієнтів не мають нормальних пероксисом і містять лише їх зачатки, позбавлені кількох матричних білків. Часто PBD є наслідком пришвидшеної деградації пероксисом внаслідок певних рех мутацій, та може бути спричинено мутаціями у протеазах комплексу AAA-ATP-аз (Lon, ClpP, HsIVU i FtsH) [77].

1.5.2 Роль пероксисом у дріжджів.

Біогенез та деградація пероксисом, а також роль цих органел у метаболізмі була вивчена у багатьох видів дріжджів. Метилотрофи є дуже зручною моделлю, що дає змогу швидко індукувати проліферацію пероксисом у середовищі з метанолом та автофагійну деградацію при перенесенні у середовище з глюкозою чи етанолом [78]. Розміри пероксисом 0,1-0,2 мкм, проте розмір, кількість та білковий вміст цих динамічних органел є змінними у відповідь на зовнішні та внутрішні чинники. Пероксисоми метилотрофних дріжджів можуть займати до 80% об'єму клітини, що ростуть у присутності метанолу за умов хемостату [79]. Цікаво відзначити, що дріжджова пероксисома - найщільніша органела з найбільшими концентраціями білка серед усіх органел. Висока концентрація білка часто призводить до утворення кристалоїдів алкогольоксидази в пероксисомному матриксі метилотрофних дріжджів (але не у *S. cerevisiae*) [69].

У дріжджів пероксисоми беруть участь у численних метаболічних процесах і містять оксидази, що продукують H_2O_2 (здебільшого використовуючи FAD⁺ як кофермент) та каталазу, яка розщеплює пероксид водню. У їх матриксному просвіті локалізуються чотири основні ферменти β-окислення, а також допоміжні пероксисомні ферменти, що беруть участь в окисленні непарних та ненасичених жирних кислот [80]. Окрім каталази, у дріжджів детоксикацію пероксиду водню здійснює пероксисомна глутатіонпероксидаза (Pmp20) [86]. У цих органелах також наявна глутатіонтрансфераза Gto1, основна роль якої пов'язана з окисновідновною регуляцією білка цистатіонін-ліази Str3, який перетворює цистатіонін на цистеїн у реакції β-дисульфідного елімінування [87].

У деяких видів дріжджів виявляється подвійна локалізація ферменту окисної частини ПФШ, малатдегідрогенази та гліколізу [82, 83, 84]. Це може бути наслідком альтернативного сплайсингу дріжджових інтронів або трансляції через стоп-кодон. Щодо локалізації гліоксилатного циклу то відомо, що у *S. cerevisiae* ізоцитратліаза є цитозольним ферментом, тоді як для інших видів цей фермент пероксисомний [81]. Для більшості дріжджів характерна виключно пероксисомна локалізація каталази, проте відомо що у *S. cerevisiae* наявна її цитозольна ізоформа [85]. Пероксисоми *S. cerevisiae*, також містять дві фосфатази, Npy1 та Pcd1, що беруть участь у метаболізмі похідних коферментів NAD⁺ і CoA [89, 90].

У метилотрофних дріжджів пероксисоми є місцем локалізації деяких ферментів окислення метанолу (алкогольоксидази, каталази та дигідроксиацетонсинтази), (формальдегіддегідрогеназа, Sтоді як інші формілглутатіонгідролаза, форміатдегідрогеназа, дигідроксиацетонкіназа та інші ферменти ксилулозомонофосфатазного шляху, та засвоєння формальдегіду) знаходяться в цитозолі. Встановлено пероксисомну локалізацію деяких ферментів пентозофосфатного шляху (крім транскетолази це пероксисомна трансальдолаза і,

39

можливо, пероксисомні ізозими пентулозофосфатепімерази та пентозофосфат ізомерази) [88].

Цікаво відзначити, незважаючи на те, що дигідроксиацетонкіназа *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* містить сигнал (PTS1) (див. нижче), відповідний білок локалізований у цитозолі [91]. Імовірно, що цей фермент складений у таку конформацію, яка робить його С-кінець недоступним для рецептора PTS1 Pex5. Мутанти по сигналу PTS1 не мають дефекту утилізації метанолу, що свідчить про активність цитозольної форми. Було висловлене припущення, що у *K. pastoris* yci ферменти ксилулозомонофосфатазного шляху розташовані у пероксисомах, і що цей вид синтезує ізозими неокислювальної частини ПФШ, із подвійною локалізацією [92].

Відсутність пероксисом зумовлює міслокалізацію ферментів пероксисомного матриксу в цитозолі. У *S. cerevisiae* це не впливає на ріст на метильованих амінах або етанолі, які зазвичай метаболізуються в пероксисомах [81]. Однак такі мутанти (у тому числі *S. cerevisiae*) не можуть рости на жирних кислотах, це можливо зумовлено отруєнням клітин надмірною концентрацією H_2O_2 , накопиченим у цитозолі.

У *О. polymorpha*, мутанти з делецією пероксисомної трансальдолази (*tal2* Δ) добре ростуть на метанолі, на відміну від мутантів з делецією цитозольної трансальдолази (*tal1* Δ), які є повністю дефектні у рості. Таким чином, пероксисомна трансальдолаза, не є необхідною для утилізації метанолу, тоді як цитозольна ізоформа є важливою для цього процесу [93].

1.5.3 Сортування білків опосередковане PTS1 та PTS2.

Відомо два основні типи сигнальних послідовностей сортування матриксних пероксисомних білків, PTS1 та PTS2 (від Peroxisomal Targeting Signal). Більшість білків пероксисомного матриксу, у яких на С-кінці поліпептидного ланцюга знаходиться PTS1-сигнальна послідовність із трьох амінокислот [S/A/C]-[K/R/H]-[L/M] (найімовірніше серин-лізин-лейцин), розпізнаються цитозольним

рецептором Pex5, на C-кінці якого знаходиться домен, що специфічно впізнає PTS1 шляхом взаємодії з чотирьма залишками аспарагіну (TPR-повтор), а мутації у цьому залишку є серед причин пероксисомних захворювань [94].

Невелика група матриксних білків спрямовується у пероксисому за допомогою PTS2, який є консервативним нонапептидом з консенсусною послідовністю [R/K]-[L/V/I]-X5-[H/Q]-[L/A] (де X означає будь-яку амінокислоту) і знаходиться поблизу N-кінця. Відомо, що у *S. cerevisiae* PTS2 використовується виключно для транспорту 3-кетоацилтіолази, у *Arabidopsis thaliana* за участю PTS2 в пероксисому імпортується не менш як 60 матриксних білків, а у нематоди *Caenorhabditis elegans* білків такого шляху не виявлено [95, 96].

1.5.4 Механізми біогенезу пероксисом. Імпорт матриксних та мембранних білків.

Механізм утворення нових пероксисом довший час був предметом дискусій. Встановлено, що існує два шляхи утворення пероксисом - це синтез *de novo is* ендоплазматичного ретикулуму та поділ існуючих пероксисом, зокрема у вищих евкаріот та *Yarrowia lipolytica* [97, 98, 99]. У *S. cerevisiae* та *O. polymorpha* пероксисоми утворюються поділом, синтез *de novo* відбувається за відсутності пероксисом у клітині.

На сьогодні відомо більше 37 генів, продукти яких необхідні для біогенезу пероксисом (*PEX* гени). Відповідні білкові продукти - пероксини беруть участь у імпорті білків пероксисомного матриксу. Докінг-білок Pex13 взаємодіє із рецептором Pex5, а Pex14 здійснює зв'язок із Pex5 та Pex7. У пероксисомному просвіті рецептор дисоціює від носія, та експортується до мембрани пероксисоми. Відомо, що інтегральні мембранні білки цинкових пальців Pex10 і Pex12 разом з білками Ubc4/5 здійснюють поліубіквитинування рецептора на мембрані за залишком лізину для подальшої його деградації RADAR (Receptor Accumulation and Degradation in the Absence of Recycling) шляхом [100, 101].

Убіквитин-конюгуючий білок Pex4 та пероксисомний мембранний білок Pex2, здійснюють моноубіквитинування рецептора Pex5 або Pex7 за залишком цистеїну для його рециклізації з пероксисомної мембрани. Перенесення здійснюється ATPазами родини AAA (Pex1 та Pex6) із витратою енергії ATP. У цитозолі рецептор зазнає деубіквитинування для наступних циклів імпорту.

Матриксний білок Pex8, зокрема у *К. pastoris*, як виключення, містить у своїй структурі обидві сигнальні послідовності сортування PTS1 та PTS2. Показано, що Pex8 взаємодіє з Pex5 стохіометрично, що призводить до вивільнення Pex8. Встановлено, що імпорт рецепторів не залежить від ATP, тому імовірно, що Pex5 утворює в ліпідному бішарі мембрани пору для проникнення імпортованих білків згідно "моделі часової пори" [102].

Два білки на зовнішній частині мембрани Pex16 і Pex17 найімовірніше залучені у імпорт ряду матриксних білків. Відомо декілька видоспецифічних пероксинів Pex16, Pex23, Pex24, Pex33, що не зустрічаються у метилотрофних дріжджів, проте виявлені у інших аскоміцетів *S. cerevisiae*, *Y. lipolyica*, *Neurospora crassa*, а Pex26 характерний тільки для ссавців. Встановлено, що різні організми різняться природою допоміжних білків для Pex7. У *S. cerevisiae* це Pex18 і Pex21, у той час як у *O. polymorpha*, *K. pastoris* і *Y. lipolytica* це Pex20 [103, 104, 105].

Цікаво, що імпорт алкогольоксидази (AO) *О. polymorpha* у пероксисому здійснюється за рахунок ферменту піруваткарбоксилази (Pyc1). На відміну від інших олігомерних білків октамерна пероксисомна FAD⁺-вмісна AO потрапляє в пероксисому у формі мономера. Звязування з FAD⁺ є обовязковою умовою імпроту, оскільки точкова мутація зв'язування з FAD⁺ повністю блокує цей процес. Цікаво також що така мутантна форма AO містить сигнал PTS1, тому очевидно, що він не розпізнається Pex5. Мутанти *pyc1 O. polymorpha* і *K. pastoris* не ростуть на метанолі та мають дуже низьку алкогольоксидазну активність, а в цитозолі у них нагромаджуються мономери AO, що не містить FAD⁺ [106].

У мутантів $pex3\Delta$ і $pex19\Delta$, що не містять "тіней" пероксисом, після інтеграції делетованого гена описано утворення пероксисом *de novo*. РМР (peroxisomal

membrane proteins) синтезуються на вільних або на ER-асоційованих рибосомах, та посттрансляційно включаються у мембрану ER, після чого за допомогою Sec61 відбувається їх транслокація, а згодом сортування у відповідні домени ER. Потім PMP експортуються з ER у складі везикул за допомогою Pex19 (у ссавців також Pex16). У цитоплазмі відбувається процес злиття везикул (за допомогою Pex1 і Pex6). Утворений комплекс здійснює імпорт матриксних білків. PMP II типу включаються безпосередньо в мембрану пероксисом за допомогою Pex3 і Pex19 [107].

У клітинах *Y. lipolytica* та ссавців щойно синтезований мембранний пероксин Рех16 вбудовується в ER і слугує каркасом для зв'язування інших пероксинів з цитоплазми (таких як Pex3 та Pmp34) [108]. Процес дещо відрізняється у дріжджів, у яких відсутній гомолог *PEX16*, наприклад у *S. cerevisiae* Pex3 спершу направляється до ER, після чого сегрегує у допероксисомну структуру разом з Pex19 який діє як рецептор і, взаємодіючи з Pex3, забезпечує імпорт інших мембранних пероксинів у пероксисому [109]. Тим не менш у *S. cerevisiae* є функціональний аналог Pex16, Pex34. А у *K. pastoris* описано пероксин Pex36, і показано функціональну комплементацію дефекту Pex 16 при його надекспресії у клітинах людини. За відсутності функціонального білка Pex25 *K. phaffii* Pex36 стає важливим для проліферації пероксисом [110].

1.5.5 Поділ пероксисом.

Білок Pex11 *S. cerevisiae* є гомологом білка Pex11В ссавців та виконує висококонсервативні функції у міцеліальних грибів, трипаносом, а також інших організмів. Посилення експресії *PEX11* у *S. cerevisiae* зумовлює формування подовжених кластерів пероксисом, та збільшення їх кількості, делеція обумовлює зменшення числа пероксисом, проте збільшення їх у розмірах. У *S. cerevisiae* цей мембранний білок представлений двома формами: фосфорильованою та без фосфатної групи. Фосфорильована форма наявна виключно в пероксисомах, що здійснюють активний поділ. Нефосфорильований білок має ER локацію, а

відповідний штам характеризується фенотипом *pex11*Δ. Фосфорилювання білка здійснюється циклін-залежною протеїнкіназою Pho85 [111].

У *S. cerevisiae* крім Pex11 до родини входять Pex25 і Pex27, які беруть участь у регулюванні розміру пероксисом. Кількість пероксисом контролюється родиною мембранних білків Pex24 (Pex24, Pex28 та Pex29). Pex24 індукується в умовах проліферації пероксисом *S. cerevisiae* при цьому спостерігається також підвищення рівня трьох білків *S. cerevisiae* (Pex30, Pex31, Pex32), що є гомологами Pex23 *Y. lipolytica* [112]. Відомо, що делеція *PEX28* і *PEX29* у *S. cerevisiae* супроводжувалась збільшенням кількості пероксисом, проте меншого розміру [113].

Під час поділу дріжджової клітини відбувається розподіл органел між материнською та дочірньою клітинами. У процесах поділу та злитті мембран бере участь родина динамін-подібних білків (великих GTPa3). У *S. cerevisiae* залучені два динамін-подібні білки, Vps1 і Dnm1. Останній контролює поділ мітохондрій, та поділ пероксисом в умовах індукції олеатом. Vps1 потрібний для поділу пероксисом в умовах репресії (в середовищі з глюкозою). Білок Mdv1, а також його паралог Caf4 звязуються з мембраною за посередництвом Fis1, та переносять в середину пероксисоми Dnm1 [114].

На відміну від *S. cerevisiae* у *O. polymorpha* білок Vps1 не бере участі у поділі пероксисом. Цей вид дріжджів має подібність до рослинних та тваринних клітин у яких даний процес контролюється Dlp1. Спільною ознакою пероксисом *S. cerevisiae* та *O. polymorpha* є наявність Emp24 родини p24, який також є локалізованим у комплексі Гольджі, ER, везикулах [115]. Делеція гена *EMP24* у *O. polymorpha* призводила до різкого зниження кількості пероксисом, що імовірно було викликано їх дефектним поділом.

У *О. polymorpha* та *S. cerevisiae* успадкування властивостей дочірніми пероксисомами залежить від білків Inp1 і Inp2, білків класу V міозинового мотору (Myo2) та актину [116]. Рух органел каталізується класом V міозинів, головним чином Myo2, який крім пероксисом відповідає за рух секреторних пухирців,

Гольджі, мітохондрій та вакуолей [117]. Inp2 - адаптерний білок Муо2, який утворює транспортний комплекс з пероксисомами. Рівень Inp2 змінюється протягом клітинного циклу, досягаючи максимальної концентрації під час перенесення пероксисоми до дочірньої клітини, опісля чого деградує [118]. Inp2 фосфорилюється під час клітинного циклу циклінзалежною кіназою Cdk1 [119]. Встановлено, що Inp2 *O. polymorpha* теж взаємодіє з Муо2, та залежить від Pex19, що виконує стабілізуючу роль [116].

Для утримання частини органел, (включаючи пероксисоми) у материнській клітині під час поділу вони закріплюються на периферії клітини шляхом утворення контакту з мембраною, або з органелами, за участю Inp1 та Pex3 [120, 121]. Inp1 необхідний для прикріплення пероксисом до Pex3, який є невід'ємною частиною як ER, так і пероксисомних мембран [122, 123]. Inp1 містить щонайменше два сайти зв'язування з Pex3 і діє як молекулярний шарнір шляхом з'єднання Pex3, пов'язаного з ER, та пероксисомного Pex3 [121]. Клітини, у яких відсутній Inp1, містять лабільні пероксисоми які переміщуються до дочірньої клітини транспортним комплексом Inp2-Myo2. Натомість штами з посиленою експресією Inp1, утримують пероксисоми у фіксованих кортикальних положеннях у материнській клітині і не переносять їх у дочірні клітини [120].

Мутанти з дефектами поділу пероксисом містять одну гігантську пероксисому, у якій присутні Inp1 та Inp2. Клітини з дефектом Inp1, демонструють меншу кількість пероксисом, проте вони є більші за розмірами порівняно з диким типом. Натомість клітини з посиленою експерсією Inp1 містять численні дрібні пероксисоми. Inp1 взаємодіє з пероксинами Pex25, Pex30 і Vps1, які модулюють етапи поділу пероксисом [120, 124].

1.6 Роль транскрипційних факторів у механізмі глюкозної репресії в *S. cerevisiae*.

Серед різноманітності субстратів для *S. cerevisiae* (як і для більшості мікроорганізмів) фаворитним є глюкоза. Підвищення концентрації цієї гексози

викликає зниження інтенсивності дихання навіть за доступності кисню, що відносить пекарські дріжджі до небагатьох "Кребтрі-позитивних" видів. Рівень позаклітинної глюкози визначається трансмембранними рецепторами: Snf3 (детектує низькі концентрації глюкози), та Rgt2 (детектує її надлишкові концентрації) [125]. Ці нетранспортуючі рецептори є на 60% ідентичні на рівні білка та мають вирішальне значення для поглинання глюкози [126].

За наявності глюкози Snf3/Rgt2 активують кінази Yck1 та Yck2, які здійснюють фосфорилювання Mth1 та Std1, що за цих умов знаходяться поблизу цi плазматичної мембрани [127]. Після чого активатори піддаються убіквитинуванню убіквітин-протеїн лігазою SCFGrr1 та деградації [128]. Натомість за умов лімітуючої концентрації глюкози Mth1 та Std1 змінюють локалізацію на ядерну, де активують peпpecop Rgt1, який у свою чергу контролює експресію низки генів, зокрема репресію генів НХТ, та генів гексокіназ [129]. У відповідь на появу глюкози Rgt1 інактивується гіперфосфорилюванням протеїнкіназою А [130]. Транспорт глюкози відбувається за механізмом полегшеної дифузії за участю високоспоріднених (НХТ2, НХТ6 і НХТ7) і низькоспоріднених (HXT1, HXT3 і HXT4) транспортерів гексоз. Високоспоріднена система (Км_{гшокоза}=1,5мМ) репресусться глюкозою, а низькоспоріднена система (Км_{глюкоза}=20-35мМ) є конститутивною [131].

Серед генів, експресія яких підлягає глюкозній репресії у дріжджів *S. cerevisiae*, є ті, що кодують білки дихальних шляхів (цитохроми), ферменти утилізації альтернативних джерел Карбону, таких як галактоза, сахароза та мальтоза, ферменти глюконеогенезу, а також пероксисомні білки [132].

Крім гліколітичного ферменту гексокінази II (*HXK2*), у *S. cerevisiae* існують ще два ферменти, здатні фосфорилювати глюкозу - гексокіназа I (*HXK1*) та глюкокіназа (*GLK1*) [133]. Нхk2 це фермент з подвійною локалізацією (цитозольною та ядерною), більш того, він існує в клітині у рівновазі між гомодимерною та мономерною формами, що контролюється фосфорилюванням мономеру за посередництвом Snf1 [134]. Поява глюкози індукує

дефосфорилювання (Ser-15) Hxk2 (та ядерну локалізацію) *in vivo* за допомогою комплексу Reg1-Glc7, який проявляє антагоністичні функції до кінази Snf1. У ядрі Hxk2 є компонентом регуляторних білок-ДНК комплексів, необхідних для репресії гена інвертази *SUC2. GLC7 (DIS2S1)* - кодує протеїн фосфатазу типу I, функції якої не є специфічними [135]. Reg1 є регулятором Glc7 у процесі глюкозної репресії [136].

Ген *MIG1* є важливим елементом механізму глюкозної репресії, який кодує білок з доменами "цинкових пальців", що приєднується до промоторів багатьох генів для їх репресії [137]. У послідовності Mig1 є два важливі внутрішні елементи:1) два RXXS мотиви - потенційні субстрати протеїнкіназ (для зняття репресії); 2) домен позитивно заряджених амінокислот (бере участь у транспорті Mig1 до ядра) [138]. Репресуючий ефект Mig1 є залежним від комплексу білків асоційованих з РНК полімеразою II, компонентами якого є Сус8 та Tup1. Сус8 є високомолекулярним білком із значним вмістом залишків глутаміну [139, 140]. На його N-кінці міститься 10 копій 34-ох амінокислотного мотиву, так званого тетратрикопептидного повтору TPR (яким взаємодіє з Tup1) [141].

Тир1 має два домени: С-кінцевий, де знаходиться сім копій послідовності βтрансдуцинового мотиву амінокислот, та N-кінцевий, з послідовністю із 72-х амінокислот для зв'язування з білком Сус8 [142, 143]. Крім цього Tup1 містить домен відповідальний за репресію транскрипції, що включає щонайменше два окремих регіони, багаті на залишки лейцину [144].

Сус8 та Tup1 є асоційовані у білковому комплексі з високою молекулярною масою, що складається з однієї Сус8 та чотирьох Tup1 субодиниць [145, 146]. Сус8-Tup1 комплекс здатен репресувати експресію різних класів генів, залежно від асоційованого з ним ДНК-зв'язуючого білка [147]. Комплекс здатен до модифікації структури хроматину і контролю за розміщенням нуклеосоми. Додатковим доказом на підтримку цієї гіпотези є спостереження про здатність Tup1 зв'язуватись з гістонами H3 та H4 [148]. Встановлено, що делеція *TUP1*, або гена деацетилази гістонів *HDA1* викликає гіперацетилювання гістонів H3/H2B

біля сайтів зв'язування Tup1 у промоторах генів. Tup1 також безпосередньо взаємодіє з Hda1 *in vitro*. Таким чином, механізм регуляції транскрипції за участю Tup1 очевидно полягає в регуляції ацетилювання гістонів, що опосередковується Hda1 [168].

При надлишку глюкози у середовищі Mig1 знаходиться у ядрі у дефосфорильованій формі у комплексі із Сус8-Тир1, Snf1 фосфорилювання зумовлює розділення комплексу [149]. Ядерний білок-рецептор Msn5, член родини білків β-імпортинів, є необхідним для експорту фосфорильованої форми Mig1 з ядра при вичерпанні глюкози. Відповідний домен зв'язування Mig1 з Msn5 перекривається з сайтами фосфорилювання (Ser-311).

Ген *SNF1* кодує серин/треонін протеїнкіназу, при відсутності або низькій концентрації глюкози, Snf1 активується фосфорилюванням за рахунок трьох кіназ - Sak1, Elm1 i Tos3, i інактивується дефосфорилюванням (Thr-210), опосередкованим Reg1-Glc7 [150, 151]. Snf1 перебуває в комплексі з іншими білками - Snf4, Sip1, Sip2, Gal83. *snf4*Δ мутанти не здатні дерепресувати гени, що котролюються катаболітною репресією, натомість *sip1*Δ, *sip2*Δ та *gal83*Δ мутанти, і навіть потрійний мутант *sip1*Δ/ *sip2*Δ/ *gal83*Δ не мають жодного дефекту регуляції експресії *GAL1* і *SUC2* генів [152, 153, 154].

Встановлено, що делеції *СYC8* та *TUP1* призводять до повного блоку репресії, тоді як делеція гена *MIG1* лише до її пошкодження. Ідентифіковано ще два гомологічних білки-репресори - продукти генів *NRG1* та *NRG2*. Nrg1 здатний зв'язуватись з промоторами репресибельних *SUC2* і *GAL* генів та містить два домени "цинкових пальців" гомологічних до Mig1 у C-кінцевій ділянці. Nrg1 та Nrg2 взаємодіють з Snf1 та Cyc8 у двогібридній системі. Делеція *NRG1* призводить до блоку репресії *STA1* [155].

У *S. cerevisiae* експозиція до глюкози активує ще один сигнальний шлях - сАМР/РКА1. G-білковий рецептор (GPCR) Gpr1 взаємодіє з гетеротримерним Gбілком Gpa2, який у свою чергу активує аденілатциклазу (кодується геном *CYR1*), яка каталізує синтез сАМР [156]. У ссавців сАМР це внутрішньоклітинний сигнал до розщеплення глікогену в печінці, та вторинний посередник для реалізації дії багатьох гормонів, нейромедіаторів і.т.д. Для амеб *Dictyostelium discoideum* секретований ними сАМР виступає сигналом для агрегації і утворення плодового тіла у несприятливих умовах [157].

сАМР переважно діє шляхом активації серин/треонінової протеїнкінази А (РКА). Висока активність РКА пригнічує транскрипцію генів з мотивами CSRE, стримуючи використання неферментативних джерел. У *S. cerevisiae* різкий сплеск рівня сАМР спричиняє РКА-опосередковану мобілізацію резервних вуглеводів трегалози та глікогену. Цей процес є сповільненим у випадку інактивації системи Gpr1/Gpa2 GPCR [158]. Ген *BCY1* кодує регуляторну субодиницю ефекторної кінази РКА. За відсутності сАМР Всу1 пригнічує активність РКА, утворюючи неактивний гетеротетрамерний комплекс з каталітичними субодиницями РКА (кодується генами *TPK1*, *TPK2* та *TPK3*). У присутності сАМР його зв'язування з Всу1 зумовлює дисоціацію останнього від комплексу, вивільняючи дві каталітичні субодиниці [159].

Після додавання глюкози відбувається зниження рівня експресії генів, що містять одну або більше елементів ССССТ в їх промоторі "STRE" (stress responsive element) елемент реагування на стрес. Встановлено сповільнення зниження рівня мРНК *SSA3* та *HSP12* у мутантів *gpr1* Δ , та *gpr1* Δ /*gpa2* Δ [160]. А також встановлено, що мутант *cyr1* Δ характеризується підвищеною стійкістю до замерзання та теплового шоку, окиснювального стресу [161, 162].

У *S. cerevisiae* активність Cyr1 стимулюється білками Ras1 та Ras2 (членами родини GTP-аз). Повідомлялось про відсутність індукції глюкозою Ras2-GTP у штама з пошкодженим фосфорилюванням глюкози ($hxk1\Delta$ / $hxk2\Delta$ / $glk1\Delta$), а надекспресія глюкокінази збільшувала Ras2-GTP, отже для сигналу важливим є саме глюкозо 6-фосфат [163]. Механізм активації Ras здійснюється білками гуанінових нуклеотидів Cdc25 (діє як медіатор сигналу індукованого глюкозою).

49

Делеція генів *IRA*, продукти яких локалізуються в мембрані та мітохондріях, а зокрема гена *IRA2*, спричиняє помітне підвищення базального рівня Ras2-GTP отже Ira1/2 є інгібіторами Ras1/2 [164]. Активація сАМР глюкозою є тимчасовим явищем. Підтримка активованої протеїнкінази під час росту на глюкозі контролюється іншим шляхом, що активується глюкозою, так званий "FGM шлях", який залежить від протеїнкінази Sch9 [165]. Функції окремих досліджуваних у цій роботі транскрипційних факторів більш детально описані у розділі "Результати".

1.7 Вплив транскрипційних факторів на алкогольну ферментацію S. cerevisiae.

Ключову роль у регуляції експресії генів, здійснюють фактори транскрипції. Ця група життєво важливих білків присутня у всіх клітинних організмів [166]. У *S. cerevisiae* виявлено близько 200 факторів транскрипції. Толерантність до етанолу у цього спиртового продуцента є важливою властивістю, що обумовлює ефективність алкогольної ферментації. Встановлено, що посилення експресії Msn2 відіграє важливу роль у алкогольній ферментації глюкози, підвищуючи толерантність до етанолу та продукцію цього спирту [167]. Заміщення залишків серину, що є мішенню для РКА (для транслокації до ядра) на аланін в положенні 582 в Msn2 у 2 рази пришвидшило ферментацію глюкози при 30 °C [168]. У середовищі з 6% етанолом встановлено вищу експресію Hxk1 у мутанта Ser582Ala, що імовірно є причиною пришвидшення гліколізу.

Msn2/Msn4 регулюють експресію гена YNR034W-A, надекспресія якого у промисловому штамі *S. cerevisiae* AR5, що використовується для виробництва текіли з *Agave tequilana* привела до пришвидшення процесу ферментації, підвищення стійкості до етанолу, високого вмісту солей та окиснювального стресу [169]. Посилення експресії генів *HSF1* та *MSN2* одержаних з термотолерантних дріжджів *K. marxianus* посилило ріст клітин при температурі 40-42 °C та підвищувало продукцію етанолу з глюкози в 1,4-1,5 раза при 43 °C.

Транскриптомний аналіз виявив, що KmMsn2 регулює гени пов'язані з метаболізмом ліпідів для зниження плинності мембрани що сприяє високотемпературній ферментації [170].

Комплекс Нар (Heme-Activator Protein), здійснює регуляцію генів, продукти яких залежать від гему та кисню. Відкриття Нар комплексу пов'язане з вивченням регуляції гена *CYC1* (кодує ізоцитохром с), транскрипція якого репресується в 5-10 раз після перенесення клітин з неферментативного субстрату на глюкозу. Комплекс Нар регулює експресію ядерних генів, що відповідають за біохімічні процеси в мітохондріях, під час росту на неферментативних джерелах Карбону [171]. Встановлено, що перенесення рекомбінантного штаму GS010 у середовище з ксилозою суттєво індукує експресію генів ЦТК, а збільшений рівень транскрипту *HAP4* свідчить, що ксилоза не сприймається як ферментативне джерело Карбону [9]. Транскрипційний рівень *HAP4* підвищений у 9 разів за аеробних умов, тому делеція *HAP4* інгібує дихання, швидкість росту, та переключає метаболізм клітин на ферментативний. Вважається, що *HAP4* і *YAP1*, який активується H_2O_2 , та необхідний при оксидативному стресі мають спільне походження [172].

Транскрипційний фактор Stb5 S. здійснює cerevisiae регуляцію пентозофосфатного шляху, активуючи експресію генів ZWF1, SOL3, GND1, GND2, RKI1, TAL1 та TKL1, та є репресором гена PGI1, що кодує глюкозо-6фосфатізомеразу, яка конкурує з Zwf1 за субстрат глюкозо-6-фосфат. Stb5 також експресію цитозольних $NADP^+$ залежних ферментів активує зокрема, ацетальдегіддегідрогеназу (Ald6), яка є важливою для росту на глюкозі, та ізоцитратдегідрогеназу (Іdp2) [173].

У попередній роботі встановлено, що посилення експресії *STB5* та *OLE1*, що кодує стеарол-СоА-9-десатуразу жирних кислот, суттєво підвищувала продукцію червоного каротиноїдного пігменту ликопіну у рекомбінантному штамі *S. cerevisiae* [174].

51

Седогептулозо-7-фосфат є ключовим субстратом для виробництва шинорінукомпоненту сонцезахисних засобів. Для збільшення пулу С-7-Ф було сконструйовано ксилозо-ферментуючий штам *S. cerevisiae*, шляхом інтеграції генів *XYL1*, *XYL2* та *XYL3 S. stipitis*. Рекомбінантний штам характеризувався слабким поглинанням ксилози, а продукція шиноріну була найвищою у середовищі, яке містило 18 г/л ксилози та 2 г/л глюкози. Синтез цієї амінокислоти додатково підвищено внаслідок делеції *TAL1* та посиленої експресії генів *STB5* та *TKL1* [175].

Відомо, що надекспресія гена *STB5 S. cerevisiae* майже повністю припиняє ріст штаму на середовищі з глюкозою [173]. Однак вплив Stb5 на алкогольну ферментацію ксилози у дріжджів залишається недослідженим. Штам з подвійною делецією двох ключових регуляторних факторів глюкозної репресії Mig1 та Snf1 збільшував продукцію етанолу у середовищі, що містило суміш цукрів (глюкози та ксилози) [176].

1.8. Підсумок.

У цьому розділі проаналізовано наукову літературу про досягнення у галузі метаболічної інженерії дріжджів *S. cerevisiae* як потенційного продуцента етанолу з ксилози. Деталізовано фізіологічне значення пероксисом та висвітлено механізми регуляції гомеостазу цих органел у дріжджів. Наведено сучасні дані впливу транскрипційних факторів у механізм глюкозної репресії та алкогольної ферментації у *S. cerevisiae*.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень.

У роботі використані хімічні сполуки, реактиви та ферменти виробництва фірм: «Sigma-Aldrich» (США), «Fluka» (Німеччина), «Fermentas» (Литва), «NEB» (США), «Promega» (США), «Reanal» (Угорщина), «Difco» (США). Кваліфікація хімічних реактивів вітчизняного виробництва – «хч» та «осч».

2.2. Штами мікроорганізмів.

Штами пекарських дріжджів *S. cerevisiae* та бактерій *E. coli*, що використовувались у даній роботі, представлені у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Штам	Генотип	Посилання
S288C		Розділ 3
GS010	pRS314-X123;	Розділ 3
	pRS314-X123;	
GS010/GFP	pGFP-PTS1;;	Пункт 3.1.1
	pRS314-X123;	
pex3∆	pSc_pex3∆-natNT2;	Пункт 3.1.2
	pRS314-X123;	
	pSc_pex3∆-natNT2 :: <i>natNT2</i>	Пункт 3.1.1
<i>pex3∆</i> /GFP	pGFP-PTS1;	Пункт 3.1.2
	pRS314-X123;	
$ctal\Delta/GFP$	pGFP-PTS1; $cta1\Delta$:: $kanMX4$	Пункт 3.1.3
	pRS314-X123;	
PEX34/GFP	pGFP-PTS1; pTEF1-PEX34;	Пункт 3.1.4
znfl∆	pRS314-X123; <i>znf1</i> ∆ :: <i>kanMX4</i>	Пункт 3.2.1
	pRS314-X123; kanMX4; pX-2-Lox-KanMX-	
ZNF1	pADH1-ZNF1	Пункт 3.2.1
$tup l\Delta$	pRS314-X123; <i>tup1</i> ∆ :: <i>kanMX4</i>	Пункт 3.2.2
$asgl\Delta$	pRS314-X123; <i>asg1</i> ∆ :: <i>kanMX4</i>	Пункт 3.2.3
$sip4\Delta$	pRS314-X123; <i>sip4</i> ∆ :: <i>kanMX4</i>	Пункт 3.2.4
	pRS314-X123; kanMX4;	
SIP4	pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1	Пункт 3.2.4
$adrl\Delta$	pRS314-X123; $adr1\Delta$:: $kanMX4$	Пункт 3.2.5

Штами мікроорганізмів, використані у дисертаційній роботі

Продовж.	табл.	2.1.
----------	-------	------

	pRS314-X123; kanMX4; pX-2-Lox-KanMX-	
ADR1	pADH1-ADR1	Пункт 3.2.5
cat8⊿	pUC57-Sc-cat8∆-natNT2	Пункт 3.2.6
	pRS314-X123; kanMX4; pX-2-Lox-KanMX-	
CAT8	pADH1- CAT8	Пункт 3.2.6
hap4∆	pRS314-X123; <i>hap4∆</i> :: <i>kanMX4</i>	Пункт 3.2.7
	pRS314-X123; kanMX4; pX-2-Lox-KanMX-	
HAP4	pADH1- HAP4	Пункт 3.2.7
	$(\Phi 80 \text{dlac} Z\Delta M15, \text{rec} A1, \text{end} A1, \text{gyr} A96, \text{thi-}$	
E. coli	1, hsdR17(r K - , m K +), supE44, relA1,	
DH5a	deoR, Δ (lacZYA-argF) U169)	Розділ 3

2.3. Вектори та праймери ПЛР.

Векторні конструкції використані у роботі, представлено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Перелік векторів, використаних у дисертаційній роботі

Назва	Посилання на конструювання
pGFP-PTS1; pRS42H-Cre	Пункт 3.1.1
pSc_pex3∆-natNT2	Пункт 3.1.2
pTEF1-PEX34	Пункт 3.1.4
pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1	Пункт 3.2.1
pX-2-Lox-KanMX-pADH1-SIP4	Пункт 3.2.4
pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ADR1	Пункт 3.2.5
pX-2-Lox-KanMX-pADH1-CAT8	Пункт 3.2.6
pX-2-Lox-KanMX-pADH1-HAP4	Пункт 3.2.7

Праймери, що використовувались у даній роботі, представлено у табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Назва	Нуклеотидна послідовність праймера 5' → 3'
праймера	
	CAA CCT ATT AAT TTC CCC TCG TCA AAA ATA AGG TTA TCA AGT GAG
Ko808	AAA TCA CCA TGA G
Ko809	GGC AAA ACA GCA TTC CAG GTA TTA GAA GAA TAT CCT GAT TCA GGT
	GAA AAT ATT G
Ko811R	CCC ATA TAA ATC AGC ATC CAT G
Ko873F	CTG CTG GAA GAT GGC GAT TAG
	ATG GCC CGC AAT AGA CAA GCG TGC GAC TGT TGT TGC ATT CGT CGA
Ko865	GTA AA
Ko776	CCG GAA TTC TGA ATG TGA AAA GGA TCA GAG GCA G
	CAG ATA CAT TAT CTG TGT TGG AAC GGA TCC ATT ATT TGC CAT AAT
Ko777	TTT GTG TCT TG

Перелік ПЛР праймерів, використаних у роботі.

Продовж. табл. 2.3.

Ko778	CAA GAC ACA AAA TTA TGG CAA ATA ATG GAT CCG TTC CAA CAC AGA TAA TGT ATC TG
Ko779	CCC AAG CTT TCA TTG GTC ACT TGA GTT GAT TTG
	TTA AGG AAG CGC ATC TAC ATC TTC TTT AGA ACC ATC TGT CGA TTC
Ko866	AAG CG
Ko867	GTC AAA AGA GCT AAA GTA AAA GAG
Ko868	GGT AAA ATG CAA GTA GCA ATG TG
	ATG ACC GCA AAG ACT TTT CTA CTA CAG GCC TCC GCT AGT CGC CCT
Ko853	CGT AG
	TCA AAA TAC TTG TAC CTT TAA AAA ATC GAC ATC TTC GTC AAG GTC
Ko854	GTC GA
Ko855	TTT GTT TTA CCT ACA TIT TCT AGT AC
K0856	GTT TTC GTT TTA TTG CAA CAT GCC
K0912	GGG AAT TCC ATA TGA CCG CAA AGA CTT TTC TAC TAC
K0913	GGG AA TIC CAT ATG CAG ACC CAT ATT IGT TIT ICA TIT IAA C
K0914 Ko015	ATCATCATA TCG AAG ITT CAC TAC
K 0913	
Ko869	AGA AGG GT
K0870	TCA TTC AGA GGG GTA ATT TAA AGG TAG GTA TTT CCC AAA TAG CTG
10070	AGC AT
Ko871	CAT AAG GTA AGA GAC AAA GAA AAA G
Ko872	TTC AGC AAG TGC TGT AGC CAC
	ATG ACT GCC AGC GTT TCG AAT ACG CAG AAT AAG CTG AAT GAG CTT
Ko930	CTC GA
	TTA ATT TGG CGC TAT TTT TTT ATA CTT CCA AAT CCT TGC TTT ACA
Ko931	ATC AC
Ko932	TAC TCT TTT TCT ATT GTT TTT TTG TC
Ко933	GTA ACT AAC TAA ACT ATT CTT CAA TTC
Ko922	CAA TCA ACT ATC TCA TAT ACA ATG GCC AAG AGG AAA TAT GGC AG
Ko923	AGC ATA GAT GGG TAA CGT TGC TCG TTA TTA ACT GTA CTT AAA GG
Ko924	CGT TAC CCA TCT ATG CTG AAG
Ko925	TGT ATA TGA GAT AGT TGA TTG TAT G
Ko914	ATC ATC ATA TCG AAG TTT CAC TAC
K0926	
K-027	$\begin{bmatrix} CAA & ICA & ACT & ATC & ICA & TAT & ACA & ATG & GCT & AAC & GTA & GAA & AAA & CCA & AAC \\ C & C & C & C & C & C \\ \hline \end{bmatrix}$
K0927	
Ko028	G
K0920	ΤΤΑ GAA AAG CAC GAA TTC AAG TC
K (<i>j</i>)2 <i>j</i>	ATG GCT AAC GTA GAA AAA CCA AAC GAT TGT TCA GGC TTT CCC GTT
Ko861	GTT GA
100001	TCA ACT GTT TCC CTT TAG ATG ATT TTC CAA AGT GTG GAA ATC ACT
Ko862	TGC CA
Ko863	CTA CTA TTC CTT ACT TTA CTA TAA G
Ko864	GAC ACA TAT CAG CAA CGA GAC
Ko915	CTA TTG TTA TGA TGG TTG GTA TTT G
Ko786	TTG GTA AGC TTC CCT TTG CAA CCT CTC CGC

Продовж. табл. 2.3.

	CTG GTG TGA GTG TCA GTA CTT ATT CGG ATC CGA AGC GAA CGT GAT
Ko787	CTT TGA TTT G
	CAA ATC AAA GAT CAC GTT CGC TTC GGA TCC GAA TAA GTA CTG ACA
Ko788	CTC ACA CCA G
Ko789	CTT TCA GGA ATT CTC TGT CCC ATG AGT CC
	CCC AAG CTT GGC GCG CCA GAT CTA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT
OK19	ATA CGA AGT TAT CTT AAC TAT GCG GCA TCA GAG
	CCC AAG CTT GGC GCG CCA GAT CTA TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT
OK20	ATA CGA AGT TAT CCG AGA TTC ATC AAC TCA TTG C
Ko790	TAT GCA ATG GTT CAA ATC TTC
Ko781	GAT GCA AAT GAT TAT ACA TG
Ko782	CTC TTA TTG ACC ACA CCT C
Ko791	
Ko799	GGG ATC CCA AAA TGT TTC TAC TCC TTT TTT AC
K0800	GTA CCC TAG AAT TTA GAT TTG TAT AGT TCA TCC ATG CC
K0801	CAA ATC TAA ATT CTA GGG TAC CAC AGG CCC CTT TTC CTT TGT C
K0802	AAC GGA ATT CCA GTA TAA TGT TAC ATG CGT ACA C
K0803	CAT TAT ACT GGA ATT CCG TTA CCC ATC TAT GCT GAA G
K0804	GAA ACA TIT TGG GAT CCC TCT GTG AGG CCG ATT ATG
K0805	GIG ICG ITA ATT ACC CGI ACT AAA G
K0806	
K0415	CGC GAC ACT CAT GAT CCC TGC GTC TAG
KVI KV2	
KV2	
KV3	
Ko964	C
Ko965	AGG AAA AGG GGC CTG TTT ATA CAA TTA TTC TAC AAA GTG TTA TTA
Ko966	ACA GGC CCC TTT TCC TTT GTC G
Ko967	TTT GTA ATT AAA ACT TAG ATT AGA TTG C
	ATG TCG AAA TTG GGA CAA GAA AAA AAT GAA GTA AAT TAC TCT
Ko997	GAT GTA AGA GAG GGA CAA CCC TTA ATT ACC GTT C
	TCA AAA TTT GGA GTT ACT CGA AAG CTC AGA AGC ATG TTT TGC CTC
Ko998	AGC TAC TTT TTG GAT CTG ATA TAC CGT TCG TAT AGC ATA C
Ko999	AAT GCA AAA AGT TGG CCG GAA TTA G
Ko1000	GAT AAT TTT TTT AAC TTT CTA ACA CGA G
ADH1F	CAA GTG TTG TTC TGA TGT CTT C
ADH1R	ATT TGA CCC TTT TCC ATC TTT TC
TKL1F	CAA CGT TCC AAT CAT GTC TG
TKLIR	TTT GAG CTC TTT CAG CAA CAC
TAL1F	
TALIR	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTG
DIVIS	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTG CAG AGA ATT TTC TGA TAC CTT C
RKI1F	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTG CAG AGA ATT TTC TGA TAC CTT C AAG TTG ACA TCA GAC AAG GAG
RKI1F RKI1R	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTG CAG AGA ATT TTC TGA TAC CTT C AAG TTG ACA TCA GAC AAG GAG TAC CGA AGT AGG CTT TTG AAG
RKI1F RKI1R RPE1F	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTG CAG AGA ATT TTC TGA TAC CTT C AAG TTG ACA TCA GAC AAG GAG TAC CGA AGT AGG CTT TTG AAG ATG GCT CTT GTT ATG ACT GTG TAC CGA CAA CAA TAA CCTTTC
RKI1F RKI1R RPE1F RPE1R	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTG CAG AGA ATT TTC TGA TAC CTT C AAG TTG ACA TCA GAC AAG GAG TAC CGA AGT AGG CTT TTG AAG ATG GCT CTT GTT ATG ACT GTG TAC CAG CGA CAA TAA CGT TG
RKI1F RKI1R RPE1F RPE1R ACO1F	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTGCAG AGA ATT TTC TGA TAC CTT CAAG TTG ACA TCA GAC AAG GAGTAC CGA AGT AGG CTT TTG AAGATG GCT CTT GTT ATG ACT GTGTAC CAG CGA CAA TAA CGT TGAAA AAA CAA GGT CTA TTG CCA TTG
RKI1F RKI1R RPE1F RPE1R AC01F AC01R	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTGCAG AGA ATT TTC TGA TAC CTT CAAG TTG ACA TCA GAC AAG GAGTAC CGA AGT AGG CTT TTG AAGATG GCT CTT GTT ATG ACT GTGTAC CAG CGA CAA TAA CGT TGAAA AAA CAA GGT CTA TTG CCA TTGGCT CAT CGT TGA AAG TAT GG

Продовж. табл. 2.3.

FUM1R	AAA TTC CTT TTC AGT CAA TAC ACC
CIT1F	TGT TGA TTC ACA TTC CGG TG
CIT1R	ATT TTT CGG TGG AGA ATG ATT TTG
MDH1F	AGG CAT CGA ATT CTT TGC ATC
MDH1R	TCT TCA AGG TTT CTT TAC ATT TTT G
PYC1F	TGA TCC ATT ACA CAT TGG TGC
PYC1R	GTC CAC ATT TTC ACC ATC AGA
FBP1F	AGA GCC CCA ACG GAA AAC
FBP1R	ATT TCA CCT GAA GAA CCC AAC
PCK1F	CAT TCT GGA TTC TAT TCA TGA TG
PCK1R	GAA ATT TTG AAC AAA CAA GTT GGC
MAE1F	TAT CGA GCA AGA ACA AGT ACC
MAE1R	CTT GAT CAT AGG TCT GTA CAC
ICL1F	TAC ACA CTA ACG CTT TAG CTG
ICL1R	GCT AAC TTC AAT AAC CCA TCG
PDC1F	CTA TCC TTG TTG CCA ACT TTC
PDC1R	ATC GAA GAC TGG CAA CAT AAC

2.4. Поживні середовища та умови вирощування.

Штами дріжджів S. cerevisiae вирощували на середовищі YPX (10 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л пептон, 20 г/л ксилоза); або на мінеральному середовищі (YNB - 1,7 г/л; (NH₄)₂SO₄ - 5 г/л; ксилоза - 20 г/л). Агаризовані середовища для бактерій та дріжджів містили 20 г/л агару. Поживні середовища стерилізували автоклавуванням, водні розчини лабільних сполук пропускали через нітроцелюлозні фільтри з діаметром пор 0,2 мкм. Для проведення біохімічних аналізів біомасу нарощували до середини логарифмічної фази росту на орбітальному шейкері (220 об/хв) при температурі 30 °С. Густину суспензії клітин дріжджів та бактерій визначали за оптичним поглинанням, шляхом фотометрування, використовуючи спектрофотометр «Helios-у» з гравіметричним калібруванням (довжина хвилі 600 нм (S. cerevisiae); 590 нм (E. coli); кювета 10 мм). Бактерійний штам *E. coli* DH5α (Ф80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r K⁻, m K⁺), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF) U169) вирощували при 37 °С на багатому середовищі LB (5 г/л дріжджовий екстракт, 15 г/л пептон, 10 г/л NaCl). Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

2.5. Біохімічні методи.

2.5.1. Отримання безклітинних екстрактів.

Безклітинний екстракт дріжджів *S. cerevisiae* отримували з використанням скляних кульок «балотіні». Клітини відділяли від культуральної рідини центрифугуванням, та додавали 50 мМ К-фосфатний буфер, pH 7,5 з 1 мМ PMSF (фенілметансульфонілфторид) 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) у кількості 3/4 від об'єму суспензії і заморожували. Клітини руйнували на дезінтеграторі протягом 15 хв при +4 °C з охолодженням на льоді через кожні 4-5 хв. Для отримання безклітинного екстракту гомогенізат центрифугували при 14000 об/хв 20 хв при +4 °C на мікроцентрифузі. Одержаний супернатант використовували для подальшого аналізу. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [177], використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт.

2.5.2. Визначення активності каталази <u>https://bio-protocol.org/e1072</u>.

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали на спектрофотометрі DR 6000 UV-VIS, реєструючи зміну оптичного поглинання пероксидом водню при довжині хвилі 240 нм. Спектрофотометр калібрували, використовуючи 400 мкл 50 мМ КР буфера та 200 мкл 30 мМ H_2O_2 в 1-мл кварцовій кюветі. Реакційну суміш готували змішуючи 200 мкл 50 мМ КР буфера, 200 мкл розведеного безклітинного екстракту. Для початку аналізу додавали 200 мкл розчину H_2O_2 (до кінцевої концентрації 10 мМ).

2.5.3. Визначення рівня концентрації АФК.

Накопичення АФК оцінювали за допомогою 2'-7'дихлорфлуоресцину чи флуоресцеїн діацетату (DCFH-DA), барвника, що проникає всередину клітини, після чого дезацетилюється клітинними естеразами до нефлуоресцентної сполуки, яка у свою чергу окислюється АФК (переважно H_2O_2) у 2'-7'дихлорфлуоресцеїн (DCF). Визначення АФК проводили як у безклітинних екстрактах так і в інтактних клітинах. Визначення проводили як описано раніше [178] з незначними модифікаціями. На першому етапі здійснювали передкультивування клітин у рідкому середовищі YP з додаванням 2% глюкози або ксилози протягом 62 годин, 200 об/хв, при 30 °C. Після промивання водою клітини у концентрації 0,03 г/л переносили у рідке середовище YNB з доданням відповідного субстрату та наступним культивуванням через ніч при 100 об/хв. На другому етапі визначали значення OD₆₀₀ для досліджуваних штамів і в залежності від нього відбирали потрібну кількість. Зразки промивали двічі 50 мМ КР буфером (pH 7,5). Для приготування робочого розчину DCFH-DA розчиняли в DMSO. Клітини інкубували в буфері, що містить 10 мкМ DCFH-DA протягом 1 години при 30 °C у темноті. Флуоресценцію вимірювали за допомогою флуориметра Turner Quantech FM 109510-33 з використанням фільтрів збудження NB490 нм, та емісії SC515 нм.

2.6. Основні молекулярно-генетичні методи.

Конструювання рекомбінантних плазмід, та інші молекулярно-генетичні методи застосовані у цій роботі здійснювали згідно методик, описаних у [179]. Зокрема для розщеплення ДНК у специфічних сайтах використано ендонуклеази рестрикції класу ІІ, виробників «NEB» (США) та «Fermentas» (Литва), та рекомендовані ними умови проведння реакції. Для дефосфорилювання липких кінців вектора використовували лужну фосфатазу фірми «NEB» (США). Для поєднання фрагментів ДНК використано ДНК-лігазу фага Т4 або метод Гібсона (Gibson assembly). Елюцію ДНК з агарозного гелю, проводили з використаням набору фірми «Quiagen» (США) (Quiagen PCR purification Kit). Підготовку компетентних клітин бактерій та електротрансформацію здійснювали за допомогою електропоратора ЕСМ600 фірми «BTX» (США) як описано раніше [179].

2.6.1. Хімічна трансформація дріжджів S. cerevisiae.

Клітини нарощували через ніч у пробірках з YPX при 30 °C з перемішуванням (220 об/хв), та переносили в колбу 300 мл YPX, початкове OD_{600} 0,2-0,3. Інкубували при 30 °C протягом 5 год з перемішуванням (230-240 об/хв), до OD_{600} 0,5-0,7. Клітини осаджували центрифугуванням при 3 тис. об/хв протягом 5 хв промивали двічі водою та ресуспендували у 25 мл стерильного буферу LiAc/TE (0,1 M LiAc, 10мM TRIS-HCl, 1мM EДTA, pH 7,5). Після інкубації (1 год. при 30 °C, 120 об/хв) осаджували центрифугуванням за тих же умов, і ресуспендували в свіжому LiAc/TE до кінцевої концентрації 5*10⁹ клітин/1мл ($OD_{600}=1$). Аліквоти по 50 мкл переносили у стерильні охолоджені мікропробірки. Додавали плазмідну ДНК (1-10 мкл) і 250 мкл холодного 50% РЕG (РЕG 3350) в LiAc/TE і енергійно перемішували. Витримували при 30 °C, 30 хв, опісля додавали DMSO (35 мкл/зразок). Клітини піддівали температурному шоку упродовж 40 хв при 42 °C. Після чого швидко охолоджували на льоді 2 хв та осаджували 3500 об/хв, 30 сек. Після ресуспендування в 2 мл YPX, залишали на ніч на круговій качалці при 120 об/хв. Клітини висівали на селективне середовище [180].

2.6.2. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів

Клітини нарощували в 3 мл рідкого селективного середовища при 30 °С до пізньої логарифмічної фази (оптична густина OD_{600} 3-4). Біомасу осаджували центрифугуванням у поліпропіленових мікропробірках та ресуспендували в 0,3 мл 50 мМ ЕДТА буферу. До ресуспендованих клітин додавали літиказу (300 U активності "Sigma") та інкубували 60 хв при 30 °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, 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 10 хв, супернатант зливали, а осад промивали 70% етанолом та підсушували. Одержану ДНК розчиняли в 30 мкл ТЕ буферу.

Для розщеплення РНК додавали 10 мкл РНКази A (10 мг/мл), перемішували та витримували при 37 °C 20 хв. Фенольною екстракцією відділяли білки від розчину ДНК (додаванням рівного об'єму суміші фенолу, струшуванням та центрифугуванням при 12 тис. об/хв, 10 хв). Верхню фазу переносили у свіжу мікропробірку. До відібраного супернатанту додавали 1/10 об'єму 3 М ацетату калію, та 2 об'єми 96% холодного етанолу. Витримували на -20 °C протягом 15 хв, осаджували 12700 об/хв, 10 хв, 4 °C. Осад промивали 70% етанолом, висушували, додавали 100 мкл ТЕ-буферу. Виділену ДНК зберігали при -20 °C.

2.6.3. Виділення плазмідної ДНК з клітин E. coli

Плазмідовмісні клітини нарошували в 100 мл середовища LB з ампіциліном (100 мг/л) протягом ночі. Біомасу осаджували центрифугуванням при 3 тис. об/хв, 10 хв при кімнатній температурі. Осад клітин ресуспендували в 1 об'ємі стабілізуючого розчину (50 мМ глюкоза; 25 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 10мМ ЕДТА (pH 8,0), додавали 2 об'єми лізуючого розчину (0,2 М розчину NaOH i 1% SDS) та 1,5 об'єми 3 М ацетат калію (pH 5,2) і витримували 5 хв на льодяній бані. Осаджували при 5 тис. об/хв протягом 7 хв, 4 °C. До відфільтрованого розчину додавали 0,6 об'єму ізопропанолу, витримували 10 хв при кімнатній температурі. Осаджували при 3 тис. об/хв протягом 10 хв за тих же умов, осад висушували, розчиняли в 500 мкл TE-буферу, переносили в свіжу пропіленову пробірку об'ємом 1,5 мл. Додавали 10 мкл PHK-ази 10 мг/мл, витримували при 37 °C 15-20 хв. Додавали 2 об'єми фенолу, інтенсивно струшували, центрифугували при 12 тис. об/хв, протягом 10 хв. Відбирали верхню фазу не зачіпаючи осаду на межі поділу фаз. До відібраного супернатанту додавали 1/10 об'єму 3М ацетат калію

(pH 5,2) та 2 об'єми 96% холодного етанолу. Витримували на -20 °С протягом 15 хв. Осаджували при 12 тис. об/хв, протягом 10 хв. при 4 °С. Супернатант зливали, осад промивали 70% етанолом 1 хв за тих же умов центрифугування, висушували, додавали 100 мкл ТЕ-буферу. Виділену плазмідну ДНК використовували для електрофоретичного дослідження.

2.6.4 Умови полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ПЛР у режимі реального часу.

Для ампліфікації цільових фрагментів ДНК у аналітичних цілях та з метою їх подальшого клонування у складі плазмід використовували метод полімеразної ланцюгової реакції. ПЛР здійснювали на ампліфікаторі Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, США). Використовуючи Taq-ДНК полімеразу виробництва фірм «Fermentas» (Литва) та «NEB» (США), Phusion® High-Fidelity «NEB» (США), синтетичні олігонуклеотидні праймери фірм «IDT Technologies» або «Sigma» (США) (табл. 2.3) умови реакції - згідно з інструкціями виробника.

Для аналізу експресії генів *ICL1*, *ACO1*, *MAE1*, *FBP1*, *PCK1*, *CIT1*, *FUM1*, *MDH1*, *PYC1*, *ADH1*, *PDC1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* та *RPE1* використовували метод полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Матрицею в реакціях слугувала одноланцюгова кДНК, синтезована за допомогою зворотної транскриптази. Сумарну PHK з клітин дріжджів виділяли з використанням набору Gene MATRIX Universal RNA Purification Kit with DNAse I (EURx Ltd., Польща). Концентрацію PHK визначали за допомогою Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer.

Кількісну ПЛР проводили на термоциклері Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System з відповідним програмним забезпеченням. У реакціях використовували набір реагентів SG OneStep qRT-PCR kit (EURx Ltd., Польща), з використанням барвника, SYBR Green згідно інструкцій виробника. Дизайн олігонуклеотидних праймерів, комплементарних до 3' - ділянок генів (табл. 2.3), здійснювали за допомогою програми «TaqMan® probe design software». 100 нг хромосомної РНК було використано в 20 мкл реакційної суміші, що містить 1 мкМ кожного праймера. Використовували наступні параметри ампліфікації: 20 хв при 50 °C та 10 хв при 95 °C підготовка, 40 циклів 10 с при 95 °C та 1 хв при 60 °C. Кратну зміну амплікона в дослідному зразку у порівнянні з контрольним зразком вимірювали в двох повторах, що були нормовані за контрольним геном *ACT1* і розраховували з використанням порівняльного методу Ct ($\Delta\Delta$ Ct).

Обрахунки проводили за формулами: ΔCt (гена-мішені) = Ct (гена-мішені) - Ct (контрольного гена *ACT1*) $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct$ (гена-мішені) - ΔCt (контрольного гена) Відносний рівень експресії виражали в 2^{- $\Delta\Delta Ct$}.

2.7. Умови алкогольної ферментації дріжджів.

Для проведення алкогольної ферментації глюкози і ксилози дріжджову біомасу нарощували на багатому середовищі YPD/YPX (10 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л пептон, 20 г/л глюкоза/ксилоза) упродовж однієї доби на орбітальному шейкері (200 об/хв) при температурі 30 °C. Клітини осаджували центрифугуванням та промивали водою. Біомасу переносили в мінеральне середовище YNB з додаванням 80 г/л глюкози (0,3 мг/мл клітин) або 40 г/л ксилози (1 мг/мл клітин).

Алкогольну ферментацію проводили на орбітальному шейкері при температурі 30 °C за умов обмеженої аерації (100 об/хв) упродовж 3 діб. Подані результати ферментації ксилози є усередненими значеннями, калькульованими щонайменше з трьох незалежних експериментів.

2.8. Делеція генів ZNF1, SIP4, ADR1, TUP1, ASG1, HAP4 та CAT8.

Для делеції генів ZNF1, SIP4, ADR1, TUP1, ASG1 та HAP4 використовували два лінійні фрагменти з гомологічною ділянкою перекриття [181], які рекомбінують *in vivo* і формують функціональний ген *kanMX4*, що забезпечує селекцію трансформантів на середовищі з генетицином. Перший лінійний фрагмент містив

50 перших нуклеотидів після старт-кодону ВРТ цільового гена та частину маркера *kanMX4*.

Перший фрагмент ампліфікували з делеційної касети pDel1, використовуючи пари праймерів Ko865/Ko808 (*ZNF1*); Ko857/Ko808 (*SIP4*); Ko861/Ko808 (*ADR1*); Ko930/Ko808 (*TUP1*); Ko869/Ko808 (*ASG1*) та Ko853/Ko808 (*HAP4*) (Послідовності всіх праймерів, представлених у табл. 2.3).

Другий лінійний фрагмент містив частину маркера *kanMX4*, ген Сге, що кодує рекомбіназу під контролем промотора *S. cerevisiae GAL1* та 50 нуклеотидів перед стоп-кодоном ВРТ цільового гена ампліфікували з делеційної касети pDel2 з використанням пар праймерів Ko866/Ko809 (*ZNF1*); Ko858/Ko809 (*SIP4*); Ko862/Ko809 (*ADR1*); Ko931/Ko809 (*TUP1*); Ko870/Ko809 (*ASG1*) та Ko854/Ko809 (*HAP4*). Обидва фрагменти були ко-трансформовані у штам GS010 за допомогою методу хімічної трансформації.

Геномну ДНК штаму *S. cerevisiae* S288C використовували як матрицю для виділення 5' і 3' некодуючих ділянок гена *CAT8* за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймерів Ko776/Ko777 і Ko778/Ko779. Отримані фрагменти 5'*CAT8* (762 т.п.н) та 3'*CAT8* (922 т.п.н) поєднували методом ПЛР з використанням праймерів Ko776/Ko779. Після обробки EcoRI / HindIII, фрагмент було клоновано у відповідні ділянки вектора pUC57.

Отримана рекомбінантна плазміда одержала назву pUC57-Sc_cat8∆. Ген *natNT2* (1318 п.н.), що надає стійкість до норзеотрецину ампліфікували, використовуючи вектор pRS41N [182] як матрицю, та пару праймерів OK19/OK20. Отриманий фрагмент було розщеплено BglII і субклоновано в лінеаризовану BamHI плазміду pUC57-Sc_cat8∆. Сконструйована плазміда отримала назву pUC57-Sc_cat8∆-natNT2. Трансформанти відбирали на твердому середовищі YPD, із додаванням 0,1 г/л норзеотрецину після трьох днів інкубації при 30 °C, та досліджували методом ПЛР з використанням геномної ДНК рекомбінантних штамів як матриці.

2.9. Посилення експресії генів ZNF1, SIP4, ADR1, HAP4 та CAT8.

BPT ZNF1 з власним термінатором було ампліфіковано з використанням Ko916/Ko917 з геномної ДНК S. cerevisiae S288C. пари праймерів Ампліфікований фрагмент було оброблено ендонуклеазою рестрикції NdeI і клоновано в Ndel-лінеаризований та дефосфорильований вектор pX-2-Lox-KanMX-pADH1. В результаті сконструйовано вектор для посилення експресії гена ZNF1 отримав назву pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1. Підтвердження ЩО коректності сконструйованого вектора було здійснено допомогою за рестрикційного аналізу. Плазміду було оброблено Notl та трансформовано в клітини ксилозо-ферментуючого штаму GS010.

ВРТ *HAP4* з власним термінатором було ампліфіковано з використанням пари праймерів Ko912/Ko913 з геномної ДНК *S. cerevisiae* S288C. Після цього ген *HAP4* був оброблений ендонуклеазою рестрикції NdeI і клоновано в NdeIлінеаризований та дефосфорильований вектор pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1 [183] замість *ZNF1* ВРТ із власним термінатором. В результаті була побудована рекомбінантна плазміда pADH1-HAP4.

Геномну ДНК штаму *S. cerevisiae* S288C використовували як матрицю для ампліфікації ВРТ *CAT8*, *SIP4* та *ADR1* з власними термінаторами із використанням праймерів Ko794F/Ko795R, Ko922/Ko923 та Ko927/Ko928 відповідно. Базову плазміду ампліфікували з використанням пари праймерів Ko924/Ko925 з плазміди рADH1-HAP4. Після чого фрагменти об'єднано за допомогою методу Гібсона, з генерацією плазмід pADH1-CAT8; pADH1-SIP4; pADH1-ADR1. У сконструйованих плазмідах гени *ZNF1*, *CAT8*, *SIP4*, *ADR1* і *HAP4* знаходились під контролем сильного конститутивного промотора гена *ADH1*, що кодує алкогольдегідрогеназу. Коректність плазмід було підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу. Плазміди було оброблено ендонуклеазою рестрикції NotI та інтегровано в геном GS010. Відбір трансформантів здійснено на твердому середовищі YPX, з додаванням 0,2 г/л генетицину.

2.10. Визначення концентрації аналітів

Концентрації аналітів в середовищі визначалася методом HPLC (PerkinElmer, Series 2000, USA) з Aminex HPX-87H іонообмінною колонкою (Bio-Rad, Hercules, USA). Рухома фаза 4 мМ H_2SO_4 була зі швидкістю потоку 0,6 мл/хв; температура колонки 35 °C.

2.11. Статистичний аналіз

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи стандартні методи. Усі досліди повторювали тричі з трьома експериментальними паралелями у кожному варіанті. Точки графіків, наведених на рисунках, та точки ординат діаграм відповідають 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 точок 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 величина «p» була меншою 0,05.

РОЗДІЛ З

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Дослідження ролі пероксисом у алкогольній ферментації ксилози у рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* GS010 (див. стор. 36).

3.1.1 Конструювання штаму S. cerevisiae з посиленою експресією гена GFP-PTS1.

Для візуалізації пероксисом *S.cerevisiae* GS010 *in vivo* використано зеле́ний флуоресце́нтний біло́к GFP (виділений з медузи *Aequorea victoria*). Ген GFP під контролем промотора гена *TEF1* (pTEF1-GFP) та термінатор гена *CYC1* (tCYC1) були ампліфіковані з плазміди p416TEF-GFP [184] використовуючи пари праймерів Ko799/Ko800 і Ko801/Ko802. Базова плазміда, що містить селективний маркер *kanMX4*, була ампліфікована використовуючи праймери Ko803/Ko804 з плазміди pCfB2055 [185]. Після елюції з гелю відповідні ПЛР-фрагменти були об'єднані разом з використанням методики Гібсона, та отримано плазміду pGFP-PTS1 (рис.3.1(A)).

Плазміда pGFP-PTS1 була оброблена рестриктазою NotI і введена в геном GS010 методом хімічної трансформації. Відібраний на середовищі з генетицином штам GS010/GFP було перевірено за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ko805/Ko806 (рис.3.1(Б)). Конститутивний промотор гена *GAP1 O. polymorpha*, що кодує гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназу та Cre рекомбіназу, ампліфікували за допомогою праймерів Ko415/KV1 та KV2/KV3 з геномної ДНК *O. polymorpha* NCYC495 та делеційної касети pDel2 [181] відповідно.

Обидва фрагменти були оброблені ендонуклеазами рестрикції SalI і HindIII і клоновані у SalI-лінеаризований і дефосфорильований вектор pRS42H [182] для одержання pRS42H-Cre. Плазмідна конструкція містить ген *hphNT1*, що забезпечує стійкість до антибіотика гігроміцину. Для вищеплення маркера *kanMX4* pRS42H-Cre було трансформовано у GS010/GFP.

67



Рис. 3.1. Кільцева схема плазміди pGFP-PTS1 (*kanMX4* - ген, що обумовлює стійкість до генетицину, фланкований lox ділянками, що дозволяє ексцизію гена після інтеграції плазміди в геном *S. cerevisiae*, *GFP-PTS1* під контролем промотора *TEF1* позначені зеленою стрілкою та білою смугою відповідно, ChX - нейтральний локус на хромосомі X для інтеграції позначений сірою з крапками смугою; бактерійна частина, що містить ген резистентності до ампіциліну (*bla*) і ORI послідовність, показані тонкими стрілками (A), електрофореграма ПЛР-аналізу трансформантів GS010/GFP та *pex3*Δ/GFP, з використанням пари праймерів Ko805/Ko806 (1, 2 - GS010/GFP; 3 - *pex3*Δ/GFP) негативний та позитивний контролі позначені як – та +; L - маркер молекулярної маси фрагментів (**Б**), флуоресцентний аналіз клітин *S. cerevisiae* GS010/GFP та *pex3*Δ/GFP, вирощених у рідкому середовищі YNB з 2% ксилозою протягом 24 годин (**B**).

Відібрані трансформанти культивували в неселективному середовищі. Дріжджові клітини висівали на середовище YPX після відповідного розведення, колонії були перенесені методом відбитків на YPX+гігроміцин та YPX+генетицин для перевірки на наявність маркеру і втрату плазміди. Штам GS010/GFP, який не містив маркерних генів використовували як реципієнта для посилення експресії гена *PEX34*, та делеції *PEX3* і *CTA1*.

Штам GS010/GFP було використано для дослідження наявності пероксисом під час алкогольної ферментації. При зброджуванні глюкози було зафіксовано швидше зниження флуоресценції GFP порівняно із зброджуванням ксилози (рис.3.2(A)). Отримані результати були підтверджені флуоресцентномікроскопічним дослідженням (рис.3.2(Б)).





Рис. 3.2. Флуориметричний аналіз штаму GS010/GFP за умов алкогольної ферментації 4% глюкози та ксилози (А), флуорисцентний аналіз штаму GS010/GFP протягом ферментації на згаданих вище субстратах (Б).

Було показано, що кількість пероксисом поступово зменшується протягом алкогольної ферментації. Однак пероксисоми довше зберігалися на ксилозі, ніж на глюкозі. Відомо, що глюкоза репресує синтез багатьох пероксисомних ферментів. Пероксисоми займають лише близько 1-2% клітинного об'єму під час росту на цьому вуглецевому субстраті [186]. Тоді як ксилоза є набагато меншим репресуючим вуглецевим субстратом і призводить до більш повільного зменшення кількості пероксисом.

Рівень АФК визначали в клітинах штаму GS010/GFP під час ферментації глюкози та ксилози з метою дослідити на якому із цих субстратів даний показник є вищим. Встановлено підвищений в 1,7-1,8 раза рівень АФК, що генерується клітинами при зброджуванні ксилози, порівняно з рівнем АФК при ферментації глюкози на 62 год культивування (табл.3.1). Збільшення генерування АФК на ксилозі можна пояснити токсичним ефектом останньої, який спостерігється у рекомбінантному штамі при культивуванні на ксилозі при концентрації вище 1% [187].

Таблиця 3.1

Штам	Активні форми кисню	
	Глюкоза	Ксилоза
GS010/GFP	1280±72	2220±111
<i>pex3∆</i> /GFP	1320±81	2253±128
cta1⊿/GFP	1291±85	2390±202
PEX34/GFP	1283±75	2230±154

Рівень активних форм кисню за умов ферментації (100 об/хв. 30°С) штамів GS010/GFP; *pex3∆*/GFP; *cta1∆*/GFP та PEX34/GFP на 36 год.

3.1.2 Конструювання, біохімічний аналіз та характеристика алкогольної ферментації штаму *S. cerevisiae* GS010/GFP з делецією гена *PEX3*, що кодує пероксисомний мембранний білок.

За біогенез пероксисом відповідають *PEX* гени. У *S. cerevisiae* встановлено функції більшості *PEX* генів шляхом делеційного аналізу. Мутант *pex17* Δ замість пероксисом містить мультимембранні структури та нездатний імпортувати деякі пероксисомні білки; *pex15* Δ накопичують матриксні пероксини у цитозолі; *pex27* Δ формує пероксисоми великого розміру, тощо. Відомо, що делеція *PEX3* та *PEX19* призводить до міслокалізації матриксних та мембранних білків [188].

Рех3 - це мембранний білок, необхідний для належної локалізації інших білків пероксисомної мембрани, а також формуванні пероксисом, що відбувається в ER, та для успадкування цих органел дочірньою клітиною [189]. Для визначеня впливу пероксисом на алкогольну ферментацію глюкози та ксилози, що є основними цукрами гідролізатів лігноцелюлози, було сконструйовано мутант з делецію гена *PEX3* на основі ксилозо-ферментуючого штаму GS010 *S. cerevisiae*.

Геномну ДНК штаму *S. cerevisiae* CEN.PK було використано як матрицю для ампліфікації 5'- та 3'- некодуючих ділянок гена *PEX3* методом ПЛР, з використанням пар праймерів Ko786/Ko787 та Ko788/Ko789. 5'PEX3 і 3'PEX3 було об'єднано за допомогою ПЛР, використовуючи праймери Ko786/Ko789. Отриманий фрагмент після обробки ендонуклеазами рестрикції EcoRI/HindIII було клоновано у відповідні сайти вектора pUC57.

Рекомбінантна плазміда одержала назву pSc_pex3 Δ . Ген *natNT2*, що обумовлює стійкість до антибіотика норзеотрецину було ампліфіковано з вектора pRS41N [182], який слугував як матриця, з використанням праймерів OK19/OK20. Одержаний фрагмент був оброблений енлонуклеазою рестрикції BglII і клонований у BamHI-лінеаризовану плазміду pSc_pex3 Δ . У результаті було сконструйовано плазміду pSc pex3 Δ -natNT2 (puc.3.3(A)).

Для конструювання *pex3*⊿, делеційна касета була ізольована з плазміди pSc_pex3∆-natNT2, шляхом її обробки EcoRI/HindIII і трансформована в

GS010/GFP. Одержані колонії були перевірені методом ПЛР, використовуючи геномну ДНК рекомбінантних штамів як матрицю. Фрагменти з очікуваними розмірами були ампліфіковані, використовуючи пари праймерів Ко790/Ко781 та Ко782/Ко791 гомологічно до послідовностей селективного маркера та регіонів за межами 5' і 3' фрагментів, використаних для рекомбінації відповідно (рис.3.3(Б),(В)).



Рис. 3.3. Схема плазміди pSc_pex3 Δ -natNT2 (*natNT2* – ген, що забезпечує стійкість до норзеотрецину (**A**), схема делеційної касети гена *PEX3*, інтегрована в геном *S. cerevisiae* із вказаними праймерами для ПЛР-аналізу (**B**), ПЛР-продукти, одержані з використанням двох пар праймерів Ко790/Ко781 та Ко782/Ко791, а також геномної ДНК штаму *pex3* Δ , використаного як матриці (**B**). L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н).

Делеція *PEX3* була підтверджена методом флуоресцентної мікроскопії та ростовим тестом на середовищі з олеатом. На рисунку 3.1 видно розсіяння GFP в цитоплазмі та відсутність мічених пероксисом у $pex3\Delta$ /GFP на відміну від вихідного штаму GS010/GFP, де пероксисоми виглядають у вигляді чітких дрібних крапок з інтенсивною флуоресценцією.

Мутант pex3//GFP демонстрував погіршений ріст на ксилозі протягом
перших 40 годин, але пізніше біомаса досягала рівня батьківського штаму (рис.3.4(А)). Помітною була і відмінність у рості на агаризованому мінеральному середовищі із цим джерелом Карбону (рис.3.4(Б)). Ненасичені вищі жирні кислоти відновлюються до насичених та після активації підлягають β -окисленню, яке відбувається в пероксисомах [65]. Як і очікувалось, *pex3* був не здатний до росту на середовищі з олеїновою кислотою (рис.3.4(В)).



Рис. 3.4. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010/GFP та $pex3\Delta$ /GFP під час аеробного культивування (200 об/хв), при 30 °C (з 1% ксилозою) (А), крапельний ростовий тест штамів на агаризованому мінеральному середовищі з 1% ксилозою як джерелом Карбону (Б), з 1% глюкозою та олеатом (В).

Наступним етапом роботи була оцінка ефективності ферментації *pex3*∆/GFP. Штам демонстрував зниження продукції етанолу з ксилози в 1,5 раза, продукуючи 3,83 г/л спирту (puc.3.5).



Рис. 3.5. Продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, поглинання ксилози і нагромадження біомаси під час ферментації ксилози штамами *S. cerevisiae* GS010/GFP та *pex3* Δ /GFP.

Рівень акумуляції біомаси штамом $pex3\Delta$ /GFP був зниженим на 10%, що узгоджувалось зі зниженим рівнем споживання ксилози на 15%. Продукція ацетату мутантом була знижена вдвічі порівняно з батьківським штамом, і становила 0,13 г/л. Продукція гліцеролу штамом $pex3\Delta$ /GFP була також зниженою на 30%, та становила 1,27 г/л, порівняно з 1,8 г/л GS010/GFP, а продукція ксиліту не відрізнялась від рівня вихідного штаму. АФК, а саме пероксид водню, утворюється та катаболізується в деяких компартментах

клітини, в тому числі в пероксисомах. Збільшення внутрішньоклітинного рівня АФК у середовищі з ксилозою (табл.3.1), довше підтримання пероксисом при ферментації цього вуглецевого субстрату (рис.3.2) порівняно з ферментацією у середовищі з глюкозою та зниження продукції етанолу штамом $pex3\Delta$ привернули нашу увагу до пероксисомних ферментів, які залучені у розщеплення пероксиду водню.

3.1.3 Конструювання, біохімічний аналіз та характеристика алкогольної ферментації штаму *S. cerevisiae* GS010/GFP з делецією гена *CTA1*, що кодує пероксисомну каталазу.

Зростання АФК активує систему антиоксидантного захисту. Пероксисомна каталаза Cta1 належить до класу оксидоредуктаз, розкладає пероксид водню, який утворюється ацил-КоА оксидазою у процесі бета-окислення жирних кислот. У *S. cerevisiae* експресія *CTA1* опосередкована активаторами транскрипції Adr1, Oaf1, Rtg1 та Rtg2 [190]. У присутності пероксиду водню каталаза також може окислювати інші сполуки, такі як формальдегід, феноли та спирти [191]. Геном *S. cerevisiae* кодує ще один функціонально схожий, проте за послідовністю дещо відмінний фермент цитоплазматичну каталазу Т (кодується *CTT1*) [192]. У багатьох анаеробних мікроорганізмів цей фермент повністю відсутній [206].

Акаталазія у людини - це спадкова хвороба, клінічними проявами якої є цукровий діабет, хвороба Альцгеймера, Паркінсона, вітіліго та ін. [193]. Ми вирішили здійснити делецію гена *CTA1 S. cerevisiae* з метою дослідити вплив пероксисомної каталази на алкогольну ферментацію ксилози. Делецію цитозольної каталази ми не здійснювали.

Для делеції *СТА1* було використано два лінійні фрагменти з гомологічною ділянкою перекриття, що при рекомбінації відновлюють ген *kanMX4*, який забезпечує селекцію дріжджових трансформантів [181]. Перший фрагмент містив 55 перших нуклеотидів після старт-кодону ВРТ *СТА1* і частину маркера *kanMX4*.

75

Перший фрагмент було отримано з касети pDel1 використовуючи пару праймерів Ko997/Ko808.

Другий лінійний фрагмент, який містив частину маркера kanMX4, рекомбіназу Сге під контролем *S. cerevisiae GAL1* промотора і 56 наступних нуклеотидів перед стоп-кодоном ВРТ гена *CTA1*, був ампліфікований з делеційної касети pDel2 використовуючи пару праймерів Ko998/Ko809 (рис.3.6(A)). Обидва фрагменти були ко-трансформовані у штам GS010/GFP. Наявність касети делеції в геномі $cta1\Delta$ /GFP підтверджено за допомогою ПЛР.

Фрагменти очікуваної величини отримано використовуючи пари праймерів Ко999/Ко811 та Ко873/Ко1000 гомологічні до послідовності маркеру *kanMX4*, Сге рекомбінази та регіонів поза межами 5' і 3' частин гена *CTA1* ВРТ використаних для рекомбінації (рис.3.6(Б)).



Рис. 3.6. Схема двокомпонентної системи для делеції гена *CTA1 S. cerevisiae*; Lox послідовності позначені чорними смугами; Cre рекомбіназа під контролем промотора гена *GAL1* позначені білою стрілкою та смугою відповідно (A), електрофореграма ПЛР-продуктів з використанням пар праймерів Ко999/Ко811 та Ko873/Ko1000 і геномної ДНК штаму *cta1* Δ як матриці для підтвердження коректності делеції гена *CTA1;* L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (Б).

Штам *cta1* Δ /GFP характеризувався зниженою акумуляцією біомаси на ксилозі, порівняно до GS010/GFP (рис.3.7(А)). Це зниження в нагромадженні біомаси було ще більш вираженим ніж у штамі *pex3* Δ /GFP. Відмінність в рості на ксилозі також чітко спостерігалася у мутанта на агаризованому мінеральному середовищі з цим субстратом (рис.3.7(Б)).



Рис. 3.7. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010/GFP та $cta1\Delta$ /GFP під час аеробного культивування (200 об/хв), при 30 °C (**A**), крапельний ростовий тест штамів на агаризованому мінеральному середовищі з 1% ксилозою як джерелом Карбону (**Б**).

Делеція *CTA1* спричинила зниження продукції етанолу з ксилози вдвічі (2,86 г/л) при порівнянні з вихідним штамом (рис.3.8). Зниження продукції етанолу корелювало з зниженою акумуляцією гліцеролу. Штами *cta1* Δ /GFP і GS010/GFP накопичували 2,0 г/л і 1,5 г/л ксиліту, відповідно. Подібний тренд у вдвічі зниженій продукції ацетату та зниженні споживання ксилози виявлено між мутантами *cta1* Δ /GFP та *pex3* Δ /GFP. Як показано на рис.3.8, продукція гліцеролу штамом *cta1* Δ /GFP становила 0,83 г/л, що є нижчим порівняно з продукцією цього поліолу штамами GS010/GFP та *pex3* Δ /GFP, які продукували 1,8 та 1,27 г/л гліцеролу, відповідно.



Рис. 3.8. Біомаса, продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, поглинання ксилози під час ферментації ксилози штамами *S. cerevisiae* GS010/GFP та *cta1*Δ/GFP.

3.1.4 Конструювання, біохімічний аналіз та характеристика алкогольної ферментації рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* з посиленою експресією гена *PEX34*, що кодує пероксисомний інтегральний білок.

Пероксин Рех34 - це пероксисомний інтегральний мембранний білок, який взаємодіє з Рех11, Рех25 та Рех27, та відповідає за конститутивний поділ, морфологію пероксисом та їх кількість протягом проліферації [194]. Раніше описано збільшення розмірів пероксисом на середовищі з глюкозою, при посиленій експресії *PEX34* [195]. Тому ми здійснили надекспресію *PEX34*, поставивши за мету посилити проліферацію пероксисом на середовищі з ксилозою.

ВРТ *PEX34* було ампліфіковано використовуючи праймери Ko964/Ko965 з геномної ДНК *S. cerevisiae* S288C. Базовий вектор було ампліфіковано, використовуючи праймери Ko966/Ko967 з плазміди pGFP-PTS1. ПЛР фрагменти об'єднані з використанням методу Гібсона у цільовий вектор, що отримав назву pTEF1-PEX34 (рис.3.9(A)). Плазміду pTEF1-PEX34 було оброблено рестриктазою NotI та використано для трансформації в геном штаму GS010/GFP. Наявність цільової касети експресії в геномі PEX34/GFP було підтверджено методом ПЛР, використовуючи пару праймерів Ko805/Ko965 (рис.3.9(Б)). Збільшення розмірів пероксисом було підтверджено методом флуоресцентної мікроскопії (рис.3.9(В)).



Рис. 3.9. Кільцева схема плазміди рТЕF1-РЕХ34 (kanMX4 - ген, що забезпечує стійкість до генетицину), lox послідовності позначені чорними смугами, *PEX34* під контролем промотора *TEF1* позначені червоною стрілкою та білою смугою відповідно, ChX - нейтральний локус на хромосомі X для інтеграції позначений сірою смугою; бактерійна частина, що містить ген резистентності до ампіциліну (*bla*) і ORI - послідовність показані тонкими стрілками (**A**),

електрофореграма ПЛР-аналізу трансформантів штаму РЕХЗ4/GFP з використанням пари праймерів Ko805/Ko965; (1, 2 - PEX34/GFP негативний контроль позначений як -; L - маркер молекулярної маси фрагментів (**Б**), флуоресцентний аналіз клітин *S. cerevisiae* GS010/GFP та PEX34/GFP, вирощених у рідкому середовищі YNB з 2% ксилозою протягом 24 годин (**B**).

Рівень накопичення біомаси PEX34/GFP був помірно збільшеним при аеробному культивуванні на ксилозі, рості на агаризованому середовищі з цією пентозою та протягом її ферментації порівняно з GS010/GFP (рис.3.10(A),(Б)).



Рис. 3.10. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010/GFP та PEX34/GFP під час аеробного культивування (200 об/хв), при 30 °C (**A**), крапельний ростовий тест штамів на агаризованому мінеральному середовищі з 1% ксилозою як джерелом Карбону (**Б**).

На наступному етапі роботи було визначено основні параметри алкогольної ферментації ксилози штамом PEX34/GFP. Штам з надекспресією *PEX34* виявляв збільшену в 1,4 раза продукцію етанолу, порівняно з батьківським штамом, що сягала 8 г/л. Підвищення продукції етанолу з ксилози корелювало з швидшим

споживанням цього субстрату, зниженою акумуляцією ксиліту, збільшеною продукцією гліцеролу та ацетату порівняно з реципієнтним штамом (рис.3.11).



Рис. 3.11. Накопичення біомаси, продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату та поглинання ксилози під час ферментації ксилози штамами *S. cerevisiae* GS010/GFP та PEX34/GFP.

Дані з (табл.3.2) вказують на те, що штам РЕХЗ4/GFP характеризується підвищеним виходом, рівнем продукції, і продуктивністю синтезу етанолу, порівняно з батьківським штамом GS010/GFP у 1,2 раза, 1,3 раза, та 1,4 раза відповідно.

Таблиця 3.2

Основні параметри ферментації ксилози штамами *S. cerevisiae* GS010/GFP, $pex3\Delta/GFP$, $cta1\Delta/GFP$ та PEX34/GFP в умовах обмеженої аерації при 30°C.

Штам	Етанол	Вихід етанолу	Рівень продукції	Продуктивність		
	(г/л)*	(г/г спожитої	етанолу (г/г	синтезу етанолу		
		ксилози)*	біомаси/год.)**	(г/л/год.)**		

Продовж. табл. 3.2.

GS010/GFP	5,87±0,17	0,257±0,004	0,248±0,008	0,140±0,005
<i>pex3∆</i> /GFP	3,83±0,18	0,197±0,005	0,153±0,009	0,096±0,006
<i>cta1∆</i> /GFP	2,86±0.17	0,156±0,004	0,138±0,008	$0,068{\pm}0,005$
PEX34/GFP	7,99±0,17	0,312±0,004	0,327±0,008	0,199±0,008

Примітка: *- Дані представлені на 62 год. ферментації; **- 14 год. ферментації.

Отримані рекомбінантні штами не відрізнялись від вихідного у накопиченні біомаси, споживанні та ферментації глюкози (рис.3.12).



Рис. 3.12. Нагромадження біомаси, продукція етанолу, гліцеролу, ацетату, поглинання глюкози під час ферментації глюкози штамами *S. cerevisiae* GS010/GFP, *pex3*Δ/GFP, *cta1*Δ/GFP та PEX34/GFP.

Результати досліджень, описані в розділі 3.1, опубліковані в наукових працях [196, 197].

3.2 Дослідження ролі транскрипційних факторів у алкогольній ферментації ксилози у рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* GS010.

3.2.1 Конструювання штамів з делецією та посиленою експресією гена *ZNF1* та їх біохімічна характеристика.

У відповідь на зовнішні та внутрішні стимули транскрипційні регулятори, зв'язуючись або безпосередньо з промотором регульованого гена, або опосередковано (через білки-трансактиватори) змінюють рівень експресії генів [198].

Транскрипційний фактор Znf1 *S. cerevisiae* належить до родини транскрипційних активаторів цинкового кластеру, та, як встановлено, зв'язується з промоторами генів, продукти яких беруть участь у клітинному диханні, глюконеогенезі, циклі трикарбонових кислот та гліоксилатному шунті.

Також продемонстрована його роль у підтримці нормальної морфології і функціонуванні мітохондрій протягом росту на дихальних субстратах, відповіді на осмотичний стрес та стрес, спричинений відхиленням від нейтрального значення pH [199]. *znf1* Δ є гіперчутливий до теплового шоку при 37°C і флуоресцентного синього барвника "Calcofluor-white", таким чином можливе його залучення у підтриманні цілісності клітинної стінки.

У *S. cerevisiae* етанол викликає індукцію експресії генів свого катаболізму, що репресуються глюкозою, особливо фосфоенолпіруват карбоксикіназа *PCK1* (46,7 раза), фруктозо1,6-бісфосфатаза *FBP1* (30,2 раза), малат синтаза *MLS1* (28,5 раза). У середовищі з цим глюконеогенним субстратом рівень експресії гена *ZNF1* підвищений близько в 5 разів [200].

Для з'ясування впливу Znf1 на алкогольну ферментацію ксилози на основі рекомбінантного штаму дріжджів *S. cerevisiae* сконструйовано похідні з делецією (рис.3.13(А)) та посиленою експресією відповідного гена. Отримання відповідних конструктів ДНК описано в розділах 2.8 та 2.9. В результаті ПЛР-скринінгу було відібрано *znf1*// штам, з хромосомної ДНК якого, було ампліфіковано фрагменти

очікуваної величини (рис.3.13(Б)), що слугувало доказом заміщення гена *ZNF1* на ген *kanMX4*.



Рис. 3.13. Схема двокомпонентної системи для делеції гена ZNF1 S. cerevisiae; Lox послідовності позначені чорними смугами; Сге рекомбіназа під контролем промотора гена GAL1 позначені білою стрілкою та смугою відповідно (A), електрофореграма ПЛР продуктів з використанням пар праймерів Ko867/Ko811R та Ko873F/Ko868 і геномної ДНК штаму $znf1\Delta$ як матриці для підтвердження коректності делеції гена ZNF1; L - маркер молекулярної маси фрагментів (величина фрагменту подана в т.п.н.) (Б).

Для з'ясування регуляторної ролі *ZNF1* у метаболізмі ксилози, експресію цього гена було посилено на основі ксилозо-ферментуючого штаму GS010 (рис.3.14(A)). Наявність цільової касети експресії в геномі трансформантів було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ко914/Ко918 (рис.3.14(Б)).



Рис. 3.14. Кільцева схема плазміди рАDH1-ZNF1. kanMX4 - ген, що забезпечує резистентність до генетицину, позначено сірою стрілкою; Lox послідовності позначені чорними смугами; ВРТ ZNF1 з власним термінатором під контролем промотора гена ADH1 позначені зеленою стрілкою та білою смугою відповідно; ChX - нейтральний локус на хромосомі X для інтеграції позначений сірою смугою; бактерійна частина, що містить ген резистентності до ампіциліну (*bla*) і ORI - послідовність показані тонкими стрілками (**A**), електрофореграма ПЛР аналізу дріжджових трансформантів з використанням праймерів Ko914/Ko918 та геномної ДНК штаму ZNF1 як матриці. Доріжки 1, 2 – відповідають ПЛР з ДНК з ZNF1; З - негативний контроль (хромосомна ДНК GS010); 4 - маркер молекулярної маси фрагментів (**Б**).

Здійснено біохімічний аналіз та характеристику алкогольної ферментації ксилози штамами з делецією та посиленою експресією гена *ZNF1*. Для аналізу ростових характеристик штами *znf1* Δ та ZNF1 підрощували в рідкому середовищі YPX протягом ночі та вносили однакову біомасу (початкова концентрація становила 0,009 г/л) у рідке середовище YNB з ксилозою (1%) як єдиним джерелом Карбону. Аналіз кінетики росту у рідкій культурі виявив, що мутант

 $znf1\Delta$ характеризується швидкістю росту аналогічною до вихідного штаму (рис.3.15(A)). Варто при цьому зауважити цікавий факт підвищення продукції етанолу в 1,34 раза мутантним штамом на 62 годину аеробного культивування у порівнянні з GS010 (рис.3.15(Б)). Штам ZNF1 демонстрував погіршений ріст на ксилозі протягом перших 44 годин культивування, найбільш виражена різниця спостерігалася на 40 годину, проте вже на 62 годину приріст біомаси практично сягав показника вихідного штаму (рис.3.15(А)).



Рис. 3.15. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010, з делецією (*znf1* Δ) або посиленою експресією (ZNF1) гена *ZNF1* під час аеробного культивування (200 об/хв), при 30 °C з 1% ксилозою (А), кількість нагромадженого етанолу (г/л) на 62 годину аеробного культивування на середовищі з 1% ксилозою (Б). Наведено середні дані двох незалежних експериментів.

Досліджено ростові характеристики і на агаризованому середовищі з 1% ксилозою. Штами підрощували через ніч, відмиті водою клітини розводили до відповідної біомаси OD (1; 0,1; 0,01; 0,001), та наносили краплею по 3 мкл на чашку. Відмінностей у рості між батьківським штамом та його похідними на агаризованому YPX не виявлено, проте мутант *znfl* Δ дещо краще ріс при 37°C на YNB з ксилозою (рис.3.16(A),(Б)).



Рис. 3.16. Крапельний ростовий тест штамів *S. cerevisiae* з делецією та посиленою експресією гена *ZNF1* на агаризованому мінеральному середовищі з 1% ксилозою як джерелом Карбону у порівнянні з батьківським штамом GS010 (A), ріст штаму *znf1* Δ на агаризованому мінеральному середовищі з ксилозою при 37 °C на третю добу культивування (**Б**).

Наступне завдання полягало у дослідженні впливу делеції та посилення експресії ZNF1 на алкогольну ферментацію ксилози. Встановлено, що ріст штаму znf1 Δ в умовах ферментації не відрізнявся від контрольного штаму. Суттєвої відмінності в продукції етанолу цим штамом також не спостерігалось (5,62 г/л), натомість продукція ксиліту підвищувалась у 1,1 раза. Продукція ацетату зростала у 1,3 раза, становлячи 0,32 г/л. Продукція гліцеролу скоротилась у 1,1 раза порівняно з GS010 (рис.3.17).

За умов алкогольної ферментації ксилози, відмінності у накопиченні біомаси між штамами ZNF1 та GS010 теж не виявлено. Найвищий вихід етанолу з ксилози спостерігали на третю добу ферментації. Продукція етанолу на 62 годину ферментації значно не відрізнялась від показника батьківського штаму (5,85 г/л) і становила 5,96 г/л. Продукція ксиліту зростала у 1,1 раза, а гліцерину знижувалась у 1,1 раза при порівнянні з вихідним штамом (рис.3.17).



Рис. 3.17. Біомаса, продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, поглинання ксилози під час ферментації ксилози штамами *S. cerevisiae* GS010; *znf1*∆ та ZNF1.

Використовуючи кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі досліджено рівень експресії певних генів в умовах ферментації ксилози, а саме: *ICL1*, *ACO1*, *MAE1*, *FBP1*, *PCK1*, *CIT1*, *FUM1*, *MDH1*, *PYC1*, *ADH1*, *PDC1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* та *RPE1* (табл.3.3). За його результатами у *znf1* Δ встановлено зниження рівня транскрипції генів *ICL1* (2 рази), *MAE1* (1,7 раза), *RKI1* (1,4 раза) та *FUM1* (1,4 раза). Натомість зафіксовано незначне підвищення експресії для двох генів неокиснювальної ланки пентозофосфатного шляху *TAL1* (1,27 раза) та *TKL1* (1,2 раза). За результатами аналізу qRT-PCR штам ZNF1 характеризувався зниженою транскрипцією генів *ICL1* (2 рази); *FUM1* (1,75 раза); *FBP1* (1,5 раза); *MAE1* (1,5 раза); *RKI1* (1,47 раза); *PCK1* (1,4 раза) та *RPI1* (в 1,2 раза). Незначне відхилення від контролю зафіксовано у *TAL1* (1,16 раза); *ACO1* (1,1 раза); *CIT1* (1,1 раза); *PDC1* (1,12 раза) та *ADH1* (1,12 раза). Транскрипційний рівень багатьох вище досліджених генів центрального вуглецевого обміну мав незначні відхилення від контрольних показників.

Таблиця 3.3

ШТАМИ	ICL1	ACO1	MAE1	FBP1	PCK1	CIT1	FUM1	MDH1	PYC1	ADH1	PDC1	TAL1	TKL1	RKI1	RPE1
GS010	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
znf1∆	0,49 ± 0,38	$0,90 \\ \pm 0,26$	0,60 ± 0,26	0,91 ± 0,15	0,95 ± 0,12	0,90 ± 0,26	0,71 ± 0,21	0,99 ± 0,01	0,98 ± 0,03	$1,27 \\ \pm 0,02$	$1,10 \\ \pm 0,11$	1,26 ± 0,16	$1,20 \\ \pm 0,26$	0,68 ± 0,26	$0,95 \\ \pm 0,1$
ZNF1	0,52 ± 0,02	$0,90 \\ \pm 0,14$	0,67 ± 0,13	$0,67 \\ \pm 0,04$	$0,70 \\ \pm 0,11$	1,0 ± 0,12	$0,57 \pm 0,35$	$0,94 \\ \pm 0,05$	1,07 ± 0,23	1,12 ± 0,16	$0,88 \\ \pm 0,09$	1,16 ± 0,22	1,06 ± 0,04	0,68 ± 0,14	$0,79 \\ \pm 0,07$
sip4∆	0,54 ± 0,15	$0,86 \\ \pm 0,05$	0,82 ± 0,23	0,62 ± 0,11	$0,86 \\ \pm 0,05$	0,63 ± 0,48	$0,8 \\ \pm 0,1$	$1,15 \\ \pm 0,03$	$0,87 \\ \pm 0,39$	$1,17 \\ \pm 0,03$	-	$1,06 \\ \pm 0,1$	0,92 ± 0,04	$0,8 \\ \pm 0,09$	1,3 ± 0,17
SIP4	0,71 ± 0,13	1,89 ± 0,22	$0,71 \\ \pm 0,19$	3,23 ± 0,44	$0,53 \\ \pm 0,09$	0,86 ± 0,17	-	$0,96 \\ \pm 0,16$	$0,67 \\ \pm 0,1$	1,19 ± 0,14	$ 1 \\ \pm \\ 0,15 $	1,34 ± 0,19	0,86 ± 0,12	$0,9 \\ \pm 0,2$	-
adr1∆	0,95 ± 0,12	1,02 ± 0,13	0,67 ± 0,23	2,41 ± 0,52	$0,62 \\ \pm 0,15$	$0,87 \\ \pm 0,1$	$0,82 \\ \pm 0,02$	$1,09 \\ \pm 0,02$	$0,71 \\ \pm 0,1$	0,89 ± 0,27	0,88 ± 0,12	$1,27 \\ \pm 0,25$	1,01 ± 0,3	1,06 ± 0,13	1,02 ± 0,03
hap4∆	0,26 ± 0,02	0,67 ± 0,33	1,33 ± 0,35	0,61 ± 0,08	0,72 ± 0,04	$0,46 \\ \pm 0,08$	$0,2 \\ \pm 0,05$	$0,4 \\ \pm 0,02$	1,04 ± 0,4	1,07 ± 0,12	0,43 ± 0,17	1,31 ± 0,36	1,25 ± 0,31	1,12 ± 0,07	1,05 ± 0,12
HAP4	0,81 ± 0,11	$1,11 \\ \pm 0,5$	1,32 ± 0,21	2,12 ± 0,42	1,31 ± 0,17	0,83 ± 0,2	0,91 ± 0,13	$0,71 \\ \pm 0,15$	$0,77 \\ \pm 0,13$	$0,71 \\ \pm 0,17$	0,8 ± 0,24	$0,88 \\ \pm 0,45$	$1,16 \pm 0,4$	$1,52 \\ \pm 0,48$	1,03 ± 0,2

Результати аналізу ПЛР у реальному часі штамів GS010, *znf1*∆, ZNF1, *sip4*∆, SIP4, *adr1*∆, *hap4*∆ та HAP4 на 36 годину ферментації ксилози

- - не визначали.

Абревіатура назв генів: *ICL1* - ізоцитрат ліаза; *ACO1* - аконітаза; *MAE1* - малатдекарбоксилаза; *FBP1* - фруктозо1,6-бісфосфатаза; *PCK1* - фосфоенолпіруват карбоксикіназа; *CIT1* - цитрат синтаза; *FUM1* - фумараза; *MDH1* - малатдегідрогеназа; *PYC1* - піруваткарбоксилаза; *ADH1* - алкогольдегідрогеназа; *PDC1* - піруватдекарбоксилаза; *TAL1* - трансальдолаза; *TKL1* - транскетолаза; *RKI1* - рибозо-5-фосфат ізомераза; *RPE1* - рибулозо-5-фосфат епімераза. Заливка кольорами: зеленим кольором позначено збільшення експресії індивідуального гена відносно штаму WT; червоним, - зниження експресії.

Встановлено, що ні делеція, ні посилена експресія ZNF1 не мали впливу на накопичення біомаси, споживання та ферментацію глюкози (рис.3.18). Продукція ацетату штамом $znfl\Delta$ була у 1,15 раза нижчою порівняно з батьківським та станловила 1 г/л.



Рис. 3.18. Нагромадження біомаси, продукція етанолу, гліцеролу, ацетату, поглинання глюкози під час ферментації глюкози штамами *S. cerevisiae* GS010, *znfl∆* та ZNF1.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що транскрипційний фактор Znf1 не задіяний в регуляції алкогольної ферментації ксилози у штаму *S. cerevisiae* GS010.

3.2.2. Отримання мутанта *tup1*∆ на основі рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* GS010, його біохімічний аналіз та вплив делеції гена *TUP1* на ферментацію ксилози та глюкози.

Тир1 - загальний репресор транскрипції, утворює комплекс з Сус8; бере участь у встановленні репресивної структури хроматину через взаємодію з гістонами H3 та H4 [201]. Tup1-Cyc8 взаємодіє з транскрипційними репресорами: MatAlpha2 [202], Mig1, Rfx1, який бере участь у репарації ДНК [203], та Sko1, який бере участь у реакціях відповіді на стрес [204]. Для з'ясування впливу Tup1 на алкогольну ферментацію ксилози на основі рекомбінантного штаму дріжджів *S. сегеvisiae* сконструйовано похідний з делецією відповідного гена (рис.3.19(А)).



Рис. 3.19. Схема двокомпонентної системи для делеції гена *TUP1 S. cerevisiae*; Lox послідовності позначені чорними смугами; Сге рекомбіназа під контролем промотора гена *GAL1* позначені білою стрілкою та смугою відповідно (А), Електрофореграма ПЛР-фрагмента ампліфікації геномної ДНК *S.cerevisiae* штаму $tup1\Delta$ з використанням пар праймерів Ko932/Ko811R для підтвердження коректності делеції гена *TUP1;* L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (Б).

У результаті ПЛР-скринінгу було відібрано *tup1*Δ штам, з хромосомної ДНК якого було ампліфіковано фрагменти очікуваної величини (рис.3.19(Б)), що слугувало доказом заміщення гена *TUP1* на ген *kanMX4*.

Делеція *TUP1* викликає зниження накопичення біомаси в 4 рази у рідкому середовищі з ксилозою в аеробних умовах (рис.3.20(А)). Штам характеризувався слабшим ростом і на агаризованому мінеральному середовищі з глюкозою; ріст був значно погіршений на середовищах з ксилозою та гліцерином, як єдиних джерелах Карбону (рис.3.20(Б)).





Рис. 3.20. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010 та *tup1* Δ під час аеробного культивування (200 об/хв) у середовищі YNB з ксилозою (1%), початкова біомаса 0,009 г/л при 30 °С (А), ріст штамів на середовищі YNB з глюкозою (1%), ксилозою (1%) та гліцеролом (1%) на 3 добу культивування (Б).

Наступним етапом роботи була перевірка ефективності ферментації ксилози та глюкози одержаним мутантом. Встановлено зниження нагромадження біомаси і

під час ферментації ксилози у 1,2 раза, продукція етанолу була знижена у 1,58 раза та становила 3,7 г/л (рис.3.21).

Спостерігалось зниження продукції гліцеролу делеційним штамом в 2,4 раза у порівнянні з вихідним штамом. Продукція гліцерину штамом *tup1*∆ становила 0,77 г/л, тоді як GS010 1,86 г/л. Штам *tup1*∆ продукував в 1,65 раза більше ксиліту при порівнянні з батьківським штамом (рис.3.21).



Рис. 3.21. Біомаса, продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, поглинання ксилози під час ферментації ксилози штамом *tup1*∆ та *S. cerevisiae* GS010.

Продукція етанолу з глюкози штамом *tup1*∆ була в 1,26 раза нижчою порівняно з реципієнтним штамом. Одержаний штам виявляв нижчий в 1,25 раза рівень нагромадження біомаси. Продукція гліцеролу та ацетату була підвищеною в 1,3 раза (рис.3.22).



Рис. 3.22. Нагромадження біомаси, продукція етанолу, гліцеролу, ацетату, поглинання глюкози під час ферментації глюкози штамами *S. cerevisiae* GS010 та *tup1Δ*.

Отримані результати свідчать, що регулятор транскрипції Tup1 залучений у процес бродіння, оскільки делеція *TUP1* негативно впливає на алкогольну ферментацію ксилози та глюкози.

3.2.3 Конструювання штаму *asg1*∆ *S. cerevisiae*, та його біохімічна характеристика.

Транскрипційний фактор Asg1 є активатором генів стресової відповіді. Asg1 належить до родини цинкового кластеру та є регулятором генів кількох метаболічних шляхів: β -окислення (*POX1*, *FOX2* та *POT1*), гліоксилатного циклу (*ICL1*), глюконеогенезу (*PCK1*), гідролізу ліпідів (*TGL3*), та імпорту довголанцюгових жирних кислот до пероксисом (*PXA1*) [205]. Враховуючи, що ксилоза виявляє токсичний ефект на клітини *S. cerevisiae* [187] ми висунули гіпотезу про

можливий регуляторний вплив Asg1 на ферментацію цієї пентози. Тому на основі GS010 було сконструйовано штам $asg1\Delta$ (рис.3.23(A)). З метою підтвердження коректності делеції використано праймери, гомологічні ділянкам ДНК, поза межами 5'- та 3'- кодуючих фрагментів гена ASG1 та праймери, комплементарні послідовності гена kanMX4 та Cre рекомбінази (Ko871/Ko811R та Ko873F/Ko872). Ізольовано $asg1\Delta$ штам, з хромосомної ДНК якого, було ампліфіковано фрагменти очікуваної величини (рис.3.23(Б)), що слугувало доказом заміщення гена ASG1 на ген kanMX4.



Рис. 3.23. Схема двокомпонентної системи для делеції гена ASG1 S. cerevisiae; Lox послідовності позначені чорними смугами; Сге рекомбіназа під контролем промотора гена GAL1 позначені білою стрілкою та смугою відповідно (A), Електрофореграма ПЛР-фрагментів ампліфікації геномної ДНК S. cerevisiae штаму $asg1\Delta$ з використанням пар праймерів Ko871/Ko811R та Ko873F/Ko872 для підтвердження коректності делеції гена ASG1; L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (Б).

Наступний етап полягав у визначенні кінетики накопичення біомаси. Встановлено, що ріст штаму $asg1\Delta$ за аеробних умов у мінеральному середовищі з ксилозою не відрізнявся від вихідного штаму (рис.3.24). Згідно результатів крапельного тесту, відмінності у рості між $asg1\Delta$ та GS010 також не виявлено при культивуванні на средовищах з ксилозою, глюкозою, гліцерином та етанолом (рис.3.25).



Рис. 3.24. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010, та *asg1*⊿ під час аеробного культивування (200 об/хв) при 30 °C у середовищі YNB з додаванням ксилози (1%); початкова біомаса 0,009 г/л.



Рис. 3.25. Ріст штаму $asg1\Delta$ порівняно з батьківським штамом на агаризованому середовищі з 1% ксилозою, або 1% глюкозою як джерелом Карбону, та на мінеральному середовищі з 3% гліцеролом та 4% етанолом.

Подальший аналіз отриманих трансформантів полягав у визначенні ефективності ферментації ксилози та глюкози. Встановлено, що блокування гена *ASG1* веде до зниження продукції етанолу з ксилози у 1,23 раза (рис.3.26). Встановлено зниження споживання цієї пентози в 1,3 раза на фоні збереженого рівня акумуляції біомаси протягом ферментації (рис.3.26). Параметри ферментації глюкози досліджуваного та батьківського штаму були загалом ідентичними (рис.3.27).



Рис. 3.26. Біомаса, продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, поглинання ксилози під час ферментації ксилози штамом *asgl* та *S. cerevisiae* GS010.



Рис. 3.27. Нагромадження біомаси, продукція етанолу, гліцеролу, ацетату, поглинання глюкози під час ферментації глюкози досліджуваними штамами.

Отже встановлено вплив делеції гена ASG1 на ферментацію ксилози S.

cerevisiae, що проявився у зниженні продукції етанолу з цього субстрату у 1,19 раза.

3.2.4 Конструювання штамів *S. cerevisiae* з делецією та посиленою експресією гена *SIP4* та їх біохімічна характеристика.

За умов вичерпання глюкози Snf1 S. cerevisiae активується фосфорилюванням та в асоціації з Snf4, Sip1, Sip2, Gal83 фосфорилює транскрипційний фактор Mig1, залучений в глюкозну репресію. Субстратом цієї протеїнкінази є транскрипційний фактор цинкового кластеру Sip4, який поряд з Нар4 в умовах дерепресії мають найбільш сильну індукцію. Sip4 взаємодіє з CSREs елементами і вважається активатором генів, що кодують ферменти глюконеогенезу [206]. Оскільки мутант з делецією $sip4\Delta$ (навіть з додатковими делеціями $sip1\Delta$; $sip2\Delta$; $sip3\Delta$) не відзначався фенотиповими змінами, це може вказувати на існування функціонального гомолога SIP4 [207]. Для визначення впливу SIP4 на алкогольну ферментацію ксилози було одержано мутант sip41 (рис.3.28(A)), та здійснено посилену експресію цього гена у штамі S. cerevisiae GS010.



Рис. 3.28. Схема двокомпонентної системи для делеції гена *SIP4 S.cerevisiae*; Lox послідовності позначені чорними смугами; Cre рекомбіназа під контролем промотора гена *GAL1* позначені білою стрілкою та смугою відповідно (А), електрофореграма ПЛР продуктів з використанням пар праймерів Ko859/Ko811R та Ko873F/Ko860 і геномної ДНК штаму *sip4*∆ як матриці; L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (Б).

Відібрані трансформанти *sip4*∆ були проаналізовані за допомогою ПЛР. Фрагменти з очікуваними розмірами були ампліфіковані за допомогою пар праймерів Ko859/Ko811R та Ko873F/Ko860 (рис.3.28(Б)).

Для посилення експресії *SIP4* сконструйовано плазміду pADH1-SIP4 (рис.3.29(А)). Наявність касети експресії в геномі трансформантів було підтверджено за допомогою ПЛР дріжджових колоній з використанням пари праймерів Ko914/Ko926 (рис.3.29(Б)).



Рис. 3.29. Кільцева схема плазміди рАDH1-SIP4. *kanMX4* - ген, що забезпечує резистентність до генетицину позначено сірою стрілкою; Lox послідовності позначені чорними смугами; ВРТ *SIP4* з власним термінатором під контролем промотора гена *ADH1* позначені жовтою стрілкою та білою смугою відповідно; ChX - нейтральний локус на хромосомі X для інтеграції позначений білою смугою з чорними крапками; бактерійна частина, що містить ген резистентності до ампіциліну (*bla*) і ORI - послідовність показані тонкими стрілками (A), Електрофореграма ПЛР-фрагментів ампліфікації геномної ДНК *S. cerevisiae* штаму SIP4 використовуючи пару праймерів Ko914/Ko926; L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (**Б**).

Накопичення біомаси штамами *sip4*⊿ та GS010 було ідентичним при культивуванні в середовищі з ксилозою за аеробних умов натомість спостерігався обмежений приріст біомаси штамом SIP4 у порівнянні з GS010 (рис.3.30(А)).

Штам SIP4 демонстрував аналогічну тенденцію погіршення росту у порівнянні із реципієнтним штамом на агаризованому середовищі із додаванням ксилози (рис.3.30(Б)). Встановлено, що посилення експресії *SIP4* не впливало на ріст на мінеральному середовищі з 3% гліцеролом та 4% етанолом як джерелом Карбону (дані не наведено).



Рис. 3.30. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010, з делецією (*sip4* Δ) або посиленою експресією (SIP4) гена *SIP4* під час аеробного культивування (200 об/хв) при 30 °C у середовищі YNB з додаванням ксилози (1%), початкова біомаса 0,009 г/л (А), крапельний ростовий тест штамів *S. cerevisiae* з делецією та посиленою експресією гена *SIP4* на агаризованому середовищі з 1% ксилозою як джерелом Карбону у порівнянні з батьківським штамом GS010 (Б).

На наступному етапі роботи було визначено основні характеристики алкогольної ферментації ксилози штамів $sip4\Delta$ та SIP4 (рис.3.31). Продукція етанолу при ферментації ксилози мутантом $sip4\Delta$ була знижена у 1,4 раза у порівнянні з батьківським і становила 4,17 г/л. Трансформанти $sip4\Delta$ повільніше утилізували ксилозу, що відобразилось зниженим накопиченням біомаси у 1,1 раза порівняно з вихідним штамом. Продукція гліцерину та ацетату була знижена

у 1,35 та 1,2 раза відповідно, в той час як продукція ксиліту зросла у 1,25 раза (рис.3.31). Згідно даних ферментації продукція етанолу штамом SIP4 була знижена більш ніж вдвічі, порівняно з батьківським, і становила 2,8 г/л. Крім цього виявлено зниження вмісту гліцеролу та зростання вмісту ксиліту в 1,25 раза у порівнянні з штамом GS010 (рис.3.31).



Рис. 3.31. Біомаса, продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, засвоєння ксилози під час ферментації ксилози штамами *S. cerevisiae* GS010; *sip4*⊿ та SIP4.

За результатами кількісного ПЛР аналізу у реальному часі встановлено, що у $sip4\Delta$ знижено транскрипцію генів *ICL1* (2 рази); *FBP1* (1,6 раза); *CIT1* (1,6 раза), та підвищено транскрипцію гена *RPE1* (1,34 раза). Відхилення в експресії інших генів були незначними: *FUM1* (1,2 раза); *RKI1* (1,2 раза); *MAE1* (1,2 раза); *ADH1* (1,2 раза); *MDH1*; *PCK1*; *ACO1*; *PYC1* (табл.3.3). Посилення експресії гена *SIP4*, напротивагу до $sip4\Delta$, значно підвищило експресію *FBP1* (3,23 раза), вказуючи на

активацію глюконеогенезу. Імовірною причиною зниженої продукції етанолу при ферментації ксилози, може бути відтік інтермедіатів неокислювальної ланки ПФШ - фруктозо-6-фосфату та гліцеральдегід-3-фосфату у глюконеогенез.

Відмінностей в продукції етанолу між рекомбінантними та батьківським штамом при ферментації глюкози не виявлено. Проте спостерігалось підвищення нагромадження біомаси штамом SIP4 у 1,18 раза, а також зниження продукції ацетату та гліцеролу у 1,2 та 1,13 раза відповідно (рис.3.32).



Рис. 3.32. Нагромадження біомаси, продукція етанолу, гліцеролу, ацетату, поглинання глюкози під час ферментації глюкози штамами *S. cerevisiae* GS010, *sip4Δ* та SIP4.

Одержані результати добре узгоджуються із зниженням продукції етанолу при алкогольній ферментації ксилози. Транскрипційний активатор Sip4 залучений у регуляцію алкогольної ферментації ксилози у *S. cerevisiae*.

3.2.5 Конструювання штамів *S. cerevisiae* з делецією та посиленою експресією гена *ADR1* та їх біохімічна характеристика.

Adr1 є позитивним регулятором транскрипції генів, що кодують пероксисомні білки, зокрема, зв'язується з промотором гена *CTA1* [208]. Adr1 та Cat8 транскрипційні регулятори, які залежать від Snf1-опосередкованої індукції та здійснюють дерепресію ряду генів, залучених у глюконеогенез та β -окислення [209]. Для визначення впливу *ADR1* на алкогольну ферментацію ксилози було одержано мутант *adr1* Δ (рис.3.33(A)), та штам з посиленою експресією гена *ADR1* у штамі *S. cerevisiae* GS010.

Трансформанти аналізували за допомогою ПЛР. Гомологічну рекомбінацію делеційної касети у цільовий локус було підтверджено з використанням праймерів Ko863/Ko811R та Ko873F/Ko864 (рис.3.33(Б)). Сконструйований штам *adr1* було використано для подальшого аналізу кінетичних параметрів росту та алкогольної ферментації ксилози.



Рис. 3.33. Схема двокомпонентної системи для делеції гена *ADR1 S. cerevisiae*; Lox послідовності позначені чорними смугами; Сге рекомбіназа під контролем промотора гена *GAL1* позначені білою стрілкою та смугою відповідно (**A**), електрофореграма ПЛР продуктів з використанням пар праймерів Ko863/Ko811R та Ko873F/Ko864 і геномної ДНК штаму $adr1\Delta$ як матриці для підтвердження коректності делеції гена *ADR1*; L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (**Б**).

Вектор для посиленої експресії *ADR1* одержав назву pADH1-ADR1 (рис.3.34(А)). Наявність цільової плазміди в геномі трансформантів було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ко914/Ко929 (рис.3.34(Б)).



Рис. 3.34. Кільцева схема плазміди рАDH1-ADR1. *kanMX4* - ген, що забезпечує резистентність до генетицину позначено сірою стрілкою; Lox послідовності позначені чорними смугами; BPT *ADR1* з власним термінатором під контролем промотора гена *ADH1* позначені голубою стрілкою та білою смугою відповідно; (A), електрофореграма ПЛР-аналізу для підтвердження наявності касети експресії в геномі штаму ADR1, використовуючи пару праймерів Ko914/Ko929 та геномну ДНК відповідного трансформанта як матрицю; L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.). (**Б**).

Делеція гена *ADR1* спричинює зниження нагромадження біомаси в 1,1 раза при порівнянні з вихідним штамом при культивуванні у рідкому середовищі з ксилозою в аеробних умовах (рис.3.35(A)). Штам ADR1 за кінетикою росту у середовищі з ксилозою в аеробних умовах не відрізнявся від GS010 (рис.3.35(A)).

Погіршення росту у мутанта $adr1\Delta$ не спостерігалося на агаризованому мінеральному середовищі з ксилозою та глюкозою. Штам $adr1\Delta$ не ріс на середовищі з гліцерином (рис.3.35(Б)), що узгоджується з результатами попередніх досліджень [210]. Відсутність росту на гліцерині може слугувати

додатковим доказом делеції гена *ADR1*. Згідно результатів крапельного тесту, надекспресуючий штам ADR1 накопичував біомасу повільніше ніж GS010 на середовищі з етанолом як джерелом Карбону (рис.3.35(Б)).



Рис. 3.35. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010, з делецією ($adr1\Delta$) або посиленою експресією (ADR1) гена *ADR1* під час аеробного культивування на середовищі YNB із додаванням ксилози (1%); (A), ріст рекомбінантних штамів GS010 $adr1\Delta$ та ADR1 на агаризованому мінеральному середовищі з 1% ксилозою, 1% глюкозою, 3% гліцеролом та 4% етанолом як джерелом карбону. (Б).

Встановлено, що як делеція так і посилена експресія гена *ADR1* призводили до зниження продукції етанолу з ксилози, яка становила 4,3 г/л для *adr1*∆ та 4,25 г/л для ADR1, тоді як вихідний штам накопичував 5,85 г/л етанолу при ферментації ксилози. Мутант *adr1*∆ характеризувався підвищеною у 1,32 раза, а ADR1 зниженою у 1,2 раза продукцією ацетату, порівняно з GS010 (рис.3.36). При

ферментації обидва штами споживали ксилози у 1,27 раза менше ніж GS010, тоді як акумуляція біомаси цими штамами не відрізнялась від батьківського (рис.3.36).

Згідно результатів кількісної ПЛР у реальному часі у $adr1\Delta$ при культивуванні на середовищі з ксилозою виявлено зниження рівня експресії двох генів, залучених у глюконеогенез *PCK1* (1,6 раза) та *MAE1* (1,5 раза), натомість рівень *FBP1* посилився (2,4 раза). Суттєвих змін в експресії інших досліджуваних генів у $adr1\Delta$ не виявлено (табл.3.3).



Рис. 3.36. Біомаса, продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, поглинання ксилози під час ферментації ксилози штамами *adr1*Δ, ADR1 та GS010.

Встановлено, що посилення експресії гена *ADR1* знижує продукцію етанолу з глюкози у 1,1 раза, а його делеція не впливає на продукцію етанолу за умов ферментації цього субстрату. Нагромадження біомаси штамом ADR1 було збільшене у 1,15 раза, продукція гліцеролу знижена в 1,3 раза, а ацетату в 1,2

раза. Акумуляція біомаси, продукування гліцеролу та ацетату штамом *adr1* було на рівні батьківського штаму (рис.3.37).



Рис. 3.37. Нагромадження біомаси, продукція етанолу, гліцеролу, ацетату, поглинання глюкози під час ферментації глюкози штамами *S. cerevisiae* GS010, *adr1*⊿ та ADR1.

Рекомбінантні штами *adr1*⊿ та ADR1 демонстрували близько 27% зниження продукції етанолу з ксилози порівняно із батьківським штамом, що вказує на залучення транскрипційного регулятора Adr1 у ферментацію ксилози.

3.2.6 Конструювання штамів *S. cerevisiae* з делецією та посиленою експресією гена *CAT8* та їх біохімічна характеристика.

S. cerevisiae Cat8 - це активатор транскрипції цинкового кластера, регулює експресію генів, що беруть участь в глюконеогенезі, утилізації етанолу, та діауксичному переході від ферментації до дихання [211, 212]. З попередніх дослідів відомо, що делеція *CAT8* покращила ферментацію глюкози у *S. cerevisiae*

[213]. Логічно припустити, що делеція відповідного гена у ксилозоферментуючому штамі *S. cerevisiae* посилить ферментацію ксилози внаслідок зміщення дихального метаболізму в сторону ферментативного. Більш того попередні дослідження в нашій лабораторії показали, що делеція *CAT8* у ксилозоферментуючих дріжджів *O. polymorpha* збільшує продукцію етанолу з ксилози на 30-50% порівняно з батьківським штамом [7].

Сконструйована плазміда отримала назву pUC57-Sc_cat8∆-natNT2 (рис. 3.38(А)). Касету для делеції виділяли з плазміди шляхом її обробки ендонуклеазами рестрикції EcoRI/HindIII і трансформували у штам *S. cerevisiae* CMB.GS010. Фрагменти очікуваних розмірів 977 п.н. та 1078 п.н. ампліфікували за допомогою пар праймерів (Ко780/Ко781 та Ко782/Ко783), гомологічно до послідовності селективного маркера та регіонів, що знаходяться поза межами 5' і З' (рис.3.38(Б),(В)).



Рис. 3.38. Схема плазміди pUC57-Sc_cat8 Δ -natNT2 (*natNT2* – ген, що забезпечує стійкість до норзеотрецину (А), схема делеційної касети гена *CAT8*, інтегрована в геном *S. cerevisiae* із вказаними праймерами для ПЛР-аналізу (Б), ПЛР-продукти, одержані з використанням двох пар праймерів Ko780/Ko781 та Ko782/Ko783, а також геномної ДНК штаму *cat8\Delta*, використаного як матриці (В). L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н).
Сконструйований вектор для посиленої експресії *САТ8* одержав назву рАDH1-CAT8 (рис.3.39(А)). Наявність цільової плазміди в геномі трансформантів було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ко792/Ко798 (рис.3.39(Б)).



Рис. 3.39. Кільцева схема плазміди рАDH1-САТ8. *kanMX4* - ген, що забезпечує резистентність до генетицину позначено сірою стрілкою; Lox послідовності позначені чорними смугами; ВРТ *CAT8* з власним термінатором під контролем промотора гена *ADH1* позначені фіолетовою стрілкою та білою смугою відповідно; (А), електрофореграма ПЛР-аналізу для підтвердження наявності касети експресії в геномі штаму САТ8, використовуючи пару праймерів Ко792/Ко798 та геномну ДНК відповідного трансформанта як матрицю; L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (Б).

На наступному етапі роботи проведено біохімічний аналіз та характеристику алкогольної ферментації ксилози штамами з делецією та посиленою експресією гена *CAT8*. Штам *cat8*∆ характеризувався пришвидшеним ростом протягом першої доби аеробного культивування, проте на 40 годину біомаса досягла значень батьківського та штаму CAT8 (рис.3.40).



Рис. 3.40. Кінетика нагромадження біомаси штамом *S. cerevisiae* GS010, та сконструйованими рекомбінантними штамами з делецією (*cat8*Δ) або посиленою експресією (CAT8) гена *CAT8* під час аеробного культивування (200 об/хв) при 30 [°]С на середовищі YNB з додаванням ксилози (1%); початкова біомаса 0,009 г/л.

Встановлено, що делеція *CAT8* приводить до збільшення накопичення етанолу у 1,1 раза порівняно з реципієнтним штамом, сягаючи 6,45 г/л (рис.3.41). Рівень продукції етанолу становить 0,3 г/г, що є вищим в 1,36 раза порівняно з GS010 (табл.3.4). Збільшення продукції етанолу з ксилози супроводжувалося зменшенням накопичення ксиліту в 1,35 раза, тоді як різниці в продукції гліцерину та ацетату не спостерігалось (рис.3.41).

Посилення експресії *САТ8* знижувало продукцію етанолу у 1,07 раза, а гліцеролу у 1,3 раза, при цьому генерація ксиліту знижувалась у 1,55 раза порівняно з GS010.



Рис. 3.41. Біомаса, продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, поглинання ксилози під час ферментації ксилози штамами *cat8Δ*, CAT8 та *S. cerevisiae* GS010.

Таблиця 3.4

Основні параметри ферментації ксилози штамами S. cerevisiae GS010, $znf1\Delta$, ZNF1, $tup1\Delta$, $asg1\Delta$, $sip4\Delta$, SIP4, $adr1\Delta$, ADR1, $cat8\Delta$, CAT8, $hap4\Delta$ та HAP4 в

Штам	Етанол (г/л)*	Вихід етанолу (г/г спожитої	Рівень продукції етанолу (г/г	Продуктивність синтезу етанолу
		ксилози)*	біомаси/год.)**	(г/л/год.)**
GS010	5,85±0,17	$0,278\pm0,004$	$0,222 \pm 0,008$	$0,128\pm0,005$
znf1∆	5,62±0,17	0,311±0,004	0,171±0,008	$0,097{\pm}0,005$

умовах обмеженої аерації при 30°С.

ZNF1	5,96±0,17	0,313±0,004	$0,25\pm0,008$	0,139±0,005
tup1∆	3,7±0,17	0,194±0,004	0,137±0,008	0,070±0,005
asg1∆	4,75±0,17	0,291±0,004	0,158±0,008	0,092±0,005
sip4∆	4,17±0,17	0,24±0,004	0,21±0,008	0,111±0,005
SIP4	2,8±0,17	0,170±0,004	0,110±0,008	0,063±0,005
adr1∆	4,32±0,17	$0,272\pm0,004$	0,137±0,008	0,079±0,005
ADR1	4,25±0,17	$0,256\pm0,004$	0,128±0,008	$0,070\pm0,005$
cat8⊿	6,45±0,17	0,29±0,004	0,3±0,008	0,14±0,005
CAT8	5,46±0,17	0,27±0,004	0,23±0,008	0,12±0,005
hap4∆	10,38±0,17	0,414±0,004	0,341±0,008	0,2±0,005
HAP4	5,2±0,17	0,272±0,004	0,126±0,008	0,074±0,005

Продовж. табл. 3.4.

Примітка: *- Дані представлені на 62 год. ферментації; **- 14 год. ферментації.

Отже, транскрипційний фактор Cat8 залучений у регуляцію ферментації ксилози. Збільшення швидкості ферментації ксилози найімовірніше пов'язане з обмеженням дихального метаболізму у штамі *cat8Δ*.

3.2.7 Конструювання штамів *S. cerevisiae* з делецією та посиленою експресією гена *HAP4* та їх біохімічна характеристика.

У *S. cerevisiae* ідентифіковано транскрипційний активатор Нар4, що відіграє ключову роль у контролі експресії генів мітохондріального дихання. Нар4 є четвертим компонентом НАР комплексу, який приєднується до ССААТ послідовностей промоторів відповідних генів, зокрема цитохром с оксидази та убіквитин цитохром *с* редуктази (*СҮТ1*, *COX5A*, *COX6*, *COX13*, *RIP1*, *QCR7* та *COR1*) [214].

Для дослідження впливу Нар4 на ферментацію ксилози були сконструйовані штами з делецією (рис.3.42(A)) та посиленою експресією гена *HAP4*. Гомологічну рекомбінацію делеційної касети в геном реципієнта було підтверджено за

допомогою ПЛР з використанням двох пар праймерів Ko855/Ko811R та Ko873F/Ko856 (рис.3.42(Б)).



Рис. 3.42. Схема двокомпонентної системи для делеції гена *HAP4 S. cerevisiae*; Lox послідовності позначені чорними смугами; Сге рекомбіназа під контролем промотора гена *GAL1* позначені білою стрілкою та смугою відповідно (А), Електрофореграма ПЛР-аналізу для підтвердження делеції гена *HAP4*. ПЛР проведено з використанням пар праймерів Ko855/Ko811R та Ko873F/Ko856 та хромосомної ДНК *hap4*Δ; L - маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (Б).

Сконструйованй вектор для експресії гена *HAP4* одержав назву pADH1-HAP4 (рис.3.43(A)). Коректність інтеграції цільової касети експресії в геном генетицинрезистентних трансформантів було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ko914/Ko915 (рис.3.43(Б)).

Стабільні рекомбінантні штами були використані у подальшому дослідженні фенотипових особливостей та ефективності утворення етанолу з ксилози.



Рис. 3.43. Кільцева схема плазміди рАDH1-НАР4 для посилення експресії гена *HAP4*. Позначення: *kanMX4* - маркерний ген, що забезпечує резистентність до генетицину позначено сірою стрілкою; Lox послідовності позначені чорними смугами; ВРТ *HAP4* з власним термінатором під контролем промотора гена *ADH1* позначені фіолетовою стрілкою та білою смугою відповідно; (A), електрофореграма ПЛР-аналізу трансформантів штаму HAP4 з використанням пари праймерів Ko914/Ko915; L - маркер молекулярної маси фрагментів (**Б**).

Штам *hap4* Δ характеризувався сповільненим ростом в рідкому середовищі з ксилозою за аеробних умов. Біомаса була знижена вдвічі на 39 годину, та на 18% на 62 годину культивування при порівнянні з GS010 (рис.3.44(A)). Мутант *hap4* Δ також виявляв погіршений ріст на агаризованих середовищах з ксилозою або гліцерином. (рис.3.44(Б)). Надекспресія *HAP4* не впливала на ріст відповідного штаму за аеробних умов культивування, та на агаризованих середовищах з ксилозою, глюкозою та гліцерином (рис.3.44(А),(Б)).





Рис. 3.44. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010, з делецією (*hap4* Δ) або посиленою експресією (HAP4) гена *HAP4* під час аеробного культивування (200 об/хв), при 30 °С. (А), крапельний ростовий тест штамів *S. cerevisiae* з делецією та посиленою експресією гена *HAP4* на агаризованому мінеральному середовищі з 1% ксилозою, 1% глюкозою або 3% гліцеролом як джерелом Карбону у порівнянні з батьківським штамом GS010 (**Б**).

У сконструйованих штамів визначали ефективність алкогольної ферментації ксилози. Штам $hap4\Delta$ при ферментації накопичував біомасу на рівні вихідного штаму упродовж перших 36 годин культивування, однак на 62 годину $hap4\Delta$ накопичував у 1,1 раза більшу біомасу, що становила 0,92 г/л. Цікаво відзначити, що при культивуванні $hap4\Delta$ за аеробних умов спостерігалось зниження накопичення біомаси. Такі відмінності у рості можна пояснити пошкодженим

клітинним диханням у *hap4* Δ , та розпізнаванням дріжджовою клітиною ксилози більше як дихального субстрату, ніж ферментативного. Продукція етанолу штамом *hap4* Δ збільшилась в 1,8 раза та становила 10,4 г/л (рис.3.45). Вихід етанолу становив 0,414 г/г (табл.3.4) та перевищував вихід етанолу батьківським штамом в 1,5 раза. Рівень продукції етанолу *hap4* Δ є в 1,5 раза вищим, і становить 0,34 г/г/год, а продуктивність є в 1,56 раза вищою порівняно з вихідним штамом (табл.3.4).



Рис. 3.45. Продукція етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, поглинання ксилози і біомаса під час ферментації ксилози штамами *S. cerevisiae hap4Δ*, HAP4 та GS010.

Різниця у зростанні продукції та виходу етанолу пов'язана з більш ефективним споживанням ксилози штамом *hap4* при порівнянні з GS010 (*hap4* споживав 25 г ксилози на 62 годину фрментації проти 21 г штамом GS010). Штам

hap4 Δ продукував ксиліту більше в 1,3 раза при порівнянні з GS010, кількість якого сягала 2 г/л. Зростання продукції ксиліту можна пояснити надлишком NADH, що виникає внаслідок блокування його окислення при диханні. Цікавою особливістю штаму *hap4* Δ є знижена практично до нуля (в 12 разів) продукція ацетату при ферментації ксилози. Зростання продукції етанолу при ферментації ксилози корелює зі зниженою продукцією ацетату. Зниження продукції ацетату також відзначено при аеробній ферментації ксилози штамом *hap4* Δ [215]. Штам *hap4* Δ характеризувався зростанням продукції гліцерину в 1,7 раза при порівнянні з вихідним штамом.

Посилення експресії *HAP4* знизило продукцію етанолу з ксилози у 1,1 раза, що становила 5,2 г/л, та збільшило накопичення ксиліту в 1,15 раза порівняно з батьківським штамом. Штам HAP4 виявляв зниження швидкості продукції етанолу та продуктивності його синтезу у 1,8 та 1,7 раза, ніж GS010, відповідно (табл.3.4).

В умовах ферментації ксилози делеція *HAP4* підвищувала експресію двох генів ПФШ: *TAL1* (1,31 раза) та *TKL1* (1,25 раза), натомість підвищення експресії *RKI1* (1,52 раза) виявлено у штама HAP4. Як і очікувалось у *hap4* Δ виявлено комплексне зниження рівня експресії генів ЦТК: *FUM1* (5 раз), *MDH1* (2,5 раза), *CIT1* (2,2 раза), *ACO1* (1,5 раза), та одного із генів гліоксилатного циклу *ICL1* (1,74 раза).

Результати RT-ПЛР показали участь Нар4 у контролі двох генів, що кодують ключові ферменти глюконеогенезу *PCK1* та *FBP1*. Делеція *HAP4* негативно позначилась на рівні експресії цих генів: у 1,38 та 1,64 раза відповідно, натомість надекспресія *HAP4* посилила експресію *PCK1* (1,31 раза) та *FBP1* (2,12 раза) (табл.3.3).

Встановлено, що посилена експресія *НАР4* знижує продукцію етанолу з глюкози у 1,1 раза. Делеція *НАР4* підвищувала нагромадження біомаси у 1,1 раза, проте не впливала на продукцію етанолу при ферментації глюкози (рис.3.46). У

обох одержаних рекомбінантних штамів нагромадження ацетату було нижчим в 1,3 раза, а гліцеролу в 1,2 раза порівняно з вихідним штамом.



Рис. 3.46. Нагромадження біомаси, продукція етанолу, гліцеролу, ацетату, поглинання глюкози і нагромадження біомаси під час ферментації глюкози штамами *S. cerevisiae* GS010, *hap4* та HAP4.

Результати досліджень, описані в розділі 3.2, опубліковані в наукових працях [216 - 220].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для зниження токсичності викидів вихлопних газів автомобільних двигунів, що використовують палива на основі нафтопродуктів споживачам доступні суміші, які у своєму складі містять оксигенати, серед них найбільш перспективним вважається етанол [221].

Розробка технології одержання етанолу другого покоління має на меті зробити можливим використання лігноцелюлозної біомаси, яка через комплексність своєї структури є більш стійкою до розщеплення. Складність конверсії лігноцелюлози є причиною нерентабельності даного процесу, хоча вартість цієї сировини є дуже низькою. Враховуючи величезне економічне значення, впровадження такої технології може розглядатися як один з факторів забезпечення енергетичної незалежності держави. Проте досі не вирішеною проблемою є відсутність мікроорганізму(-ів), для ефективної конверсії вивільнених мономерів до етанолу [44].

Виробництво етанолу другого покоління передбачає зброджування суміші цукрів у присутності інгібуючих сполук, тому мікроорганізм, що здійснює алкогольну ферментацію повинен відповідати низці критеріїв. Вони включають здатність до ефективної ферментації принаймні глюкози та ксилози, високу стійкість до утворюваного етанолу, максимальну термотолерантність для проведення SSF процесу, мінімальну кількість побічних продуктів, мінімальні поживні потреби та ін.

Хоча ксилоза є найбільш поширеною пентозою в складі лігноцелюлози і другим за кількістю моносахаридом після глюкози. У природі виявлено дуже незначну кількість видів мікроорганізмів (зокрема дріжджів), котрі мають здатність до її ферментації. Використовуючи різні експериментальні підходи значно підвищено ефективність ферментації ксилози до етанолу у етанологенних бактерій, проте дріжджі мають суттєві переваги як організми-ферментатори, а саме більший розмір, тому їх легше відокремити від культуральної рідини, та не чутливість до фаголізису.

Перспективним організмом, що може уможливити у майбутньому здійснення SSF процесу є рекомбінантні штами термотолерантних дріжджів *O. polymorpha*. Серед природних штамів задовільними параметрами ферментації ксилози дріжджі S. passalidarum, які теж володіють характеризуються значним потенціалом подальшої інженерії. Певні для види роду Brettanomyces використовують широкий спектр джерел Карбону та виявляють надзвичайно високу стійкість до етанолу [222]. Спільною метаболічною ознакою S. passalidarum та Brettanomyces bruxellensis є відсутність глюкозної репресії в аеробних умовах [223].

Об'єктом, що найширше використовується для отримання харчового та технічного етанолу, є дріжджі *S. cerevisiae*. За ефективністю генерації цільового продукту з глюкози спиртові дріжджі залишаються абсолютним лідером, що і стало причиною багаточисленних спроб оптимізації ферментації ксилози у цього організму. Здійснено експресію гетерологічних шляхів катаболізму ксилози, генів неокисної ланки ПФШ, модифіковано окисно-відновний баланс клітини проведено білкову інженерію транспортерів цукрів та ін. [224, 225, 226].

Існуючі на даний час рекомбінантні штами пекарських дріжджів потребують вдосконалення таких їх властивостей як ефективність утилізації п'ятивуглецевих цукрів, оптимізації біосинтезу етанолу, здатності до продукції білків для забезпечення прямої конверсії лігноцелюлози в етанол, або для її попереднього гідролізу.

Існує декілька доказів участі пероксисом або пероксисомних ферментів у регулюванні алкогольної ферментації ксилози. Зокрема метилотрофні дріжджі *О. polymorpha* з дефіцитом пероксисом, внаслідок мутацій *pex3*∆ і *pex6*∆ втратили здатність продукувати етанол з ксилози, зберігаючи при цьому здатність до ферментації глюкози [227].

На сьогоднішній день виявлено більше 37 генів, відповідальних за біогенез пероксисом. Аналізуючи поведінку пероксисом під час алкогольної ферментації нами було зафіксовано швидше зниження флуоресценції GFP на глюкозі порівняно з ксилозою, тобто кількість пероксисом поступово зменшується у ході ферментації. Показано, що пероксисоми довше зберігалися в клітинах, вирощених в середовищі з ксилозою, ніж в середовищі з глюкозою, що може свідчити про їхню пряму чи опосередковану участь в алкогольній ферментації цієї пентози.

Раніше вважалось що дріжджі *S. cerevisiae* не містять пероксисомних ферментів, що беруть безпосередню участь у алкогольній ферментації ксилози, проте у цій роботі показано, що дефіцит пероксисом призводить до часткового уповільнення продукції етанолу з ксилози. Одна з важливих функцій пероксисом - детоксикація пероксиду водню, що утворюється під час бета-окислення жирних кислот у пероксисомах, опосередкована матриксною каталазою. У цій роботі вперше продемонстровано що пероксисомна каталаза Cta1 є необхідною для ефективного росту на ксилозі та її ферментації до етанолу.

Делеція гена *CTA1* призводить до зниження накопичення біомаси у середовищі з ксилозою як джерелом Карбону, а також до погіршення параметрів ферментації цієї пентози до етанолу. Тому дуже цікаво було б дослідити вплив посилення експресії *CTA1* на ефективність алкогольної ферментації ксилози у ксилозоферментуючому штамі *S. cerevisiae*.

Профілі ферментацій ксилози у мутантів *pex3* і *cta1* дуже схожі. Однак делеція *CTA1*, яка повністю виключає активність каталази виявляє більш негативний ферментацію ксилози. порівнюючи виражений вплив на 3 параметрами ферментації у *pex3* . Ми не виключаємо, що у мутанта *pex3* Cta1 міслокалізований у цитозоль, що забезпечує детоксикацію пероксиду водню. Спостерігається аномальне накопичення активної каталази у цитозолі хворих при синдромі Зельвегера [228]. Ми не вимірювали питому активність каталази у $pex3\Delta$, причини зниження продукції етанолу з ксилози у 1,5 раза штамом $pex3\Delta$ не встановлені.

Збільшення розміру пероксисом у рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* GS010 підвищувало накопичення етанолу в 1,4 раза під час ферментації ксилози. Такий вплив може бути пов'язаний з більш ефективним рівнем детоксикації пероксиду водню, однак інші механізми, що призводять до поліпшення продукції етанолу з ксилози також не виключені і потребують подальшого дослідження. Таким чином, отримані результати підтвердили нашу гіпотезу про те, що пероксисоми беруть участь у регуляції алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* GS010, а дефіцит цих органел зменшує продукцію етанолу з ксилози.

Важливо відзначити, що у метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* вплив пероксисом на алкогольну ферментацію ксилози має цілком інший механізм, який пов'заний з міслокалізацією пероксисомної дигідроксиацетонсинтази Das1. Цей фермент виконує роль транскетолази, яка безпосередньо залучена в катаболізм ксилози. Проте, для одних з найліпших ферментаторів ксилози, дріжджів *S. stipitis*, встановлено, що переоксисоми участі в регуляції алкогольної ферментації не беруть [227].

Результати даної роботи розкривають важливу роль пероксисом/пероксисомних ферментів у ферментації ксилози, оскільки виявлено нові мішені для поліпшення характеристик алкогольної ферментації цієї пентози.

Серед кількох десятків факторів транскрипції які містять амінокислотну послідовність мотиву $Zn(II)_2Cys_6$ та залучені в регуляцію багатьох клітинних процесів *S. cerevisiae* були досліджені Znf1, Asg1, Sip4, Cat8 та Adr1, а також репресори Tup1та Hap4, що не належать до цієї родини.

У даній роботі вивчалися зазначені транскрипційні фактори, оскільки їх вплив на регуляцію алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних ксилозоутилізуючих штамів *S. cerevisiae* не досліджено. Схема досліджень цієї частини роботи представлена на рис.4.1.



Рис. 4.1. Схема роботи з рекомбінантним штамом GS010 для визначення ролі транскрипційних факторів у процесі алкогольної ферментації.

Znf1 регулює експресію генів, продукти яких беруть участь у глюконеогенезі, гліоксилатному циклі та ЦТК [199], гліколізі, метаболізмі пірувату та ферментації. Посилення експресії *ZNF1* під контролем сильного конститутивного промотора *TP11* підвищує продукцію етанолу в умовах ферментації з високою концентрацією глюкози на 14–24%, найімовірніше через залучення Znf1 до стійкості клітини в умовах осмотичного стресу [229].

Нами встановлено, що Znf1 не залучений в регуляцію алкогольної ферментації ксилози у *S. cerevisiae*, оскільки суттєвої відмінності в продукції етанолу з ксилози та глюкози між штамами *znf1* Δ ; ZNF1 та GS010 не виявлено. Кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі досліджених генів, а саме: *ICL1*, *ACO1*, *MAE1*, *FBP1*, *PCK1*, *CIT1*, *FUM1*, *MDH1*, *PYC1*, *ADH1*, *PDC1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* та *RPE1* виявив незначні відхилення від контрольних показників.

У даній роботі встановлено роль гена *TUP1*, який кодує складову комплексу репресії глюкозою, у регуляції ферментації ксилози та глюкози у штаму GS010. Показано, що делеція *TUP1* зумовлює зниження швидкості росту у середовищі з ксилозою. Продукція етанолу з глюкози та нагромадження біомаси у $tup1\Delta$ знизилось у 1,3 раза, у той час як споживання глюкози залишилось на рівні вихідного штаму.

Попередньо було встановлено, що делеція *TUP1 S. cerevisiae* не посилювала метаболізм мальтози за умов коферментації глюкози та мальтози [230]. $tup1\Delta$ не характеризувався посиленим бродінням галактози з гідролізатів червоних водоростей. Однак посилена експресія усіченого гена *TUP1* (без C-кінцевого домену репресії), підвищує вихід етанолу з галактози у 2,5 раза порівняно з контрольним штамом [231].

Попередньо було показано, що делеція гена ASG1, який є активаторм генів стресової відповіді у *S. cerevisiae*, призводить до підвищеної чутливості до оцтової кислоти. А делеція ASG1 Candida glabrata до нездатності регулювати внутрішньоклітинний рН, що веде до гальмування росту в кислому середовищі [232]. Шляхом еволюційної інженерії отримано мутант *S. cerevisiae*, стійкий до оцтової кислоти, при цьому ASG1 - один із чотирьох генів, мутації у яких є причиною цього явища [233].

Вплив делеції чи посилення експресії ASG1 на ферментацію ксилози досі не досліджувався. У даній роботі встановлено вплив делеції гена ASG1 на ферментацію ксилози *S. cerevisiae* GS010, що проявився у зниженні продукції етанолу з цього субстрату у 1,19 раза. Рівень нагромадження біомаси під час аеробного культивування на ксилозі $asg1\Delta$ відповідав батьківському штаму.

Для виявлення ролі гена *SIP4* (білковий продукт якого є активатором генів, що кодують ферменти глюконеогенезу) у процесі алкогольної ферментації ксилози було одержано мутант *sip4* Δ , та здійснено посилення експресії гена *SIP4* у штамі *S. cerevisiae* GS010. Встановлено, що продукція етанолу при ферментації ксилози штамом *sip4* Δ була знижена на 29%.

Продукція етанолу штамом SIP4 була знижена більш ніж вдвічі, порівняно з батьківським штамом, і сягала 2,8 г/л. За результатами кількісного ПЛР-аналізу основною причиною зниження рівня виходу етанолу при ферментації ксилози, імовірно є те, що інтермедіати гліколізу утворені у реакціях неокисної ланки ПФШ більш інтенсивно порівнюючи із штамом дикого типу перетворюються до глюкози.

Досліджено алкогольну ферментацію ксилози у штамів з делецією та посиленою експресією гена *ADR1*. *ADR1* кодує білок, залучений у активацію глюконеогенезу та β -окислення. Обидва досліджувані штами демонстрували близько 27% зниження продукції етанолу порівняно із батьківським штамом. Параметри ферментації глюкози *adr1* Δ не були відмінні від батьківського штаму, тоді як продукція етанолу штамом ADR1 була зменшена в 1,1 раза.

 $adr1\Delta$ характеризувався збільшенням рівня експресії *FBP1* у 2,4 раза, що свідчить про регуляторний вплив даного ТФ на глюконеогенез, а активація ключового ферменту Fbp1 веде до зниження продукції етанолу. Посилення експресії *FBP1* у $adr1\Delta$ може відбуватися внаслідок блокування репресора транскрипції *FBP1*, активатором якого імовірно є *ADR1*.

Для з'ясування регуляторної ролі *САТ8*, який відповідає за переключення катаболізму субстрату від ферментації до дихання у метаболізмі ксилози одержано штами з делецією та посиленою експресією цього гена. Встановлено, що мутант *cat8* характеризується збільшенням нагромадження етанолу в 1,1 раза, що становить 6,45 г/л, а рівень продукції етанолу є вищим в 1,36 раза порівняно з GS010. Посилення експресії *САТ8* практично не впливало на продукцію етанолу (табл.3.3).

Таким чином, отримані результати підтвердили нашу гіпотезу про те, що Cat8 регуляцію алкогольної ферментації залучений V ксилози V ксилозоферментуючому штамі S. cerevisiae, а делеція відповідного гена збільшує продукцію Цi результати добре узгоджуються з попередніми етанолу. дослідженнями наших співробітників, які показали участь Cat8 у регуляції ферментації ксилози у природніх і рекомбінантних ксилозо-ферментуючих штамів O. polymorpha [7].

Для дослідження ролі Нар4 *S. cerevisiae*, який контролює експресію генів мітохондріального дихання, у процесі ферментації ксилози сконструйовано штами з делецією та посиленою експресією гена *НАР4*. Слід відзначити суттєвий негативний вплив мутації *hap4*/₂ на ріст у аеробних умовах, а також на

агаризованому мінеральному середовищі з дихальними субстратами як джерелами Карбону.

Пошкодження *HAP4* веде до зростання продукції етанолу з ксилози, мутант продукує 10,4 г/л етанолу, при цьому вихід цього спирту сягає 0,414 г/г. Штам HAP4 продукує у 1,1 раза менше етанолу з глюкози порівняно з GS010. Не виявлено відмінностей між *hap4* Δ та батьківським штамом у накопиченні біомаси та продукції етанолу при ферментації глюкози. *hap4* Δ та HAP4 утворювали відповідно в 1,2 та 1,3 раза меншу кількість гліцерину та ацетату порівняно з штамом GS010.

У ксилозо-ферментуючих штамах *S. cerevisiae* ксилоза є більш дихальним субстратом, ніж ферментативним [234, 235]. Тому зниження дихального метаболізму з метою посилення алкогольної ферментації ксилози є логічним підходом. Раніше було показано, що природні ферментатори ксилози штами дріжджів *S. stipitis* та *O. polymorpha* з пошкодженим диханням продукують підвищену кількість етанолу з ксилози [7, 236]. Також було показано, що ксилозоутилізуючий штам *S. cerevisiae* з пошкодженим диханням після адаптивної еволюції характеризувався поліпшеним споживанням ксилози та підвищеним виходом етанолу з цього субстрату [237].

Нар4 є глобальним регулятором експресії генів дихального ланцюга, тому цей транскрипційний фактор є дуже привабливою мішенню для вивчення розподілу метаболічного потоку між процесами дихання та ферментації. Транскрипційний аналіз рекомбінантного промислового штаму *S. cerevisiae* показав, що рівень транскрипції гена *HAP4* є в 7 раз вищим у середовищі з ксилозою, ніж з глюкозою [238].

Ефект делеції *HAP4* на основі ксилозо-ферментуючого штаму *S. cerevisiae* вже був досліджений раніше [215]. Було показано, що вихід етанолу у *hap4*∆ становив 0,23 г/г спожитої ксилози, тоді як батьківський штам був не здатний продукувати етанол з ксилози в аеробних умовах.

Нам вдалося досягти вищого виходу етанолу, що досягає 0,41 г/г в умовах обмеженої аерації, використовуючи більш високу початкову концентрацію ксилози (40 г/л) (табл.3.3). Близько 40% ксилози залишилося неспожитою, аналогічно описаним раніше результатам [215].

Штам *hap4* продукує у 1,3 рази більше ксиліту, ніж GS010, досягаючи 2 г/л, що можна пояснити надлишком NADH внаслідок блокування окислення цього кофактора диханням. Підвищення продукції етанолу мутантом *hap4* , очевидно, безпосередньо пов'язане з різким зниженням рівня продукування ацетату. Попередні результати свідчать про аналогічне зниження кількості ацетату у *hap4* в аеробних умовах [215].

У попередніх дослідах штам *S. cerevisiae* з посиленою експресією *HAP4* характеризувався зниженою продукцією етанолу на 17% та підвищеним рівнем акумуляції біомаси на 10% порівняно з реципієнтним штамом на середовищі, що містило глюкозу [239]. Згідно з нашими результатами посилення експресії *HAP4* також веде до зниження продукції етанолу, однак накопичення біомаси було схожим між HAP4 та GS010.

Відомо, що при ферментації за умов мікроаерації у хемостаті мутант *hap4* Δ *S. cerevisiae* характеризувався підвищеним виходом етанолу з глюкози та зниженою акумуляцією біомаси [240]. Схожі результати спостерігали для *hap4* Δ *S. cerevisiae* в умовах аеробного періодичного культивування у середовищі з глюкозою, а саме зниження нагромадження біомаси та підвищений вихід етанолу на 10% [238]. Також відомо, що делеція *HAP4* в *Meyerozyma guilliermondii* в 3 рази підвищувала вихід етанолу з глюкози в аеробних умовах [241]. У нашій же роботі мутант *hap4* Δ не відрізнявся за виходом біомаси та етанолу від вихідного штаму під час ферментації глюкози.

Використовуючи кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі досліджено рівень експресії низки генів, і таким чином виявлено вплив *НАР4* на алкогольну ферментацію ксилози. Делеція гена *НАР4* знижувала експресію генів ключового етапу клітинного дихання - ЦТК, який є проміжним елементом між гліколізом та електронтранспортним ланцюгом (рис.4.2).



Рис. 4.2. Вплив транскрипційних факторів (*ADR1*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1* та *ZNF1*) на алкогольну ферментацію ксилози у рекомбінантних штамів S. cerevisiae.

посилення експресії гена; — - пригнічення експресії гена.
 Кольорові стрілки вказують на кількість продукованого етанолу (г/л) під час ферментації ксилози. Кожен штам позначений відповідним кольором.

Також встановлено незначне зниження експресії двох основних ферментів глюконеогенезу *PCK1* та *FBP1*, та, відповідно, підвищення їх експресії у штама НАР4. Попередньо показано, що посилення експресії ксилулокінази, та чотирьох генів ПФШ: *RPE1*, *RKI1*, *TAL1* та *TKL1* значно покращувало ріст на ксилозі, та параметри її алкогольної ферментації за анаеробних умов у *S. cerevisiae* [43]. Проте у наших експериментах делеція *HAP4* не мала суттєвого впливу на експресію генів ПФШ: *TAL1* (в 1,31 раза) та *TKL1* (в 1,25 раза), а штам НАР4 демонстрував незначне підвищення експресії *RKI1*(1,5 раза).

Цікавим продовженням даної роботи було би дослідження впливу інших транскрипційних факторів на процес алкогольної ферментації глюкози, серед яких Gcr1, Gcr2, Mig1, Mig2 займають чільне місце. Промислово затребуваними є які не здатні до продукції етанолу штами дріжджів для отримання безалкогольного пива. Мутант S. cerevisiae $gcrl \Delta$ характеризусться нормальним ростом на неферментативних джерелах Карбону, але виявляє сильний дефект росту в присутності глюкози, навіть за наявності неферментативних джерел Карбону [242]. Mig2 активується в умовах низького вмісту глюкози та переноситься в мітохондрію, де взаємодіє з Ups1, антагонізує фактор ділення мітохондрій Dnm1, що свідчить про участь у регуляції морфології цих органел [243].

Підсумовуючи наведені результати експериментальних досліджень можна стверджувати, що у штаму *S.cerevisiae* GS010, здатного до утилізації ксилози, пошкодження гена *PEX3*, що кодує пероксисомний мембранний білок, так само як і гена *CTA1*, що кодує пероксисомну каталазу, призводить до зниження продукції етанолу з ксилози.

Додатково встановлено вищий в 1,7-1,8 раза рівень АФК досліджуваних штамів під час зброджування ксилози, порівняно до ферментації глюкози. Збільшення продукції етанолу з ксилози було досягнуто за рахунок посилення проліферації пероксисом шляхом надекспресії *PEX34*.

Встановлено, що делеція та посилення експресії генів, що кодують транскрипційні фактори *ADR1*, *ASG1*, *SIP4* та *TUP1*, призводили до зниження продукції етанолу при ферментації ксилози, а делеція гена *HAP4* веде до зростання продукції етанолу в 1,8 раза при порівнянні з вихідним штамом. Важливим наступним етапом даної роботи буде вивчення впливу транскрипційних факторів на алкогольну ферментацію суміші цукрів, насамперед глюкози та ксилози, як основних компонентів гідролізатів рослинної біомаси.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі ідентифіковано та описано ряд раніше невідомих фактів щодо регуляторних механізмів ферментації у дріжджів. Вперше показано залучення пероксисом у процес ферментації ксилози у рекомбінантного штаму *S. cerevisiae*. Виявлено, що блокування дихання шляхом делеції гена *HAP4* поліпшує продукцію етанолу при ферментації ксилози. Сконструйовані штами можуть слугувати основою для подальших генно-інженерних маніпуляцій, та еволюційної інженерії.

Основні наукові та практичні результати роботи викладено у наступних висновках:

1. Сконструйовано рекомбінантний штам *S. cerevisiae* з делецією гена *PEX3*, що кодує пероксисомний мембранний білок. Штам $pex3\Delta$ не формує пероксисом та характеризується зниженою в 1,5 раза продукцією етанолу при ферментації ксилози, порівняно з вихідним штамом, вказуючи на функціональну значимість пероксисом під час ферментації ксилози.

2. Встановлено, що посилення експресії гена *PEX34*, що кодує пероксисомний інтегральний мембранний білок, приводить до формування пероксисом більшого розміру та підвищує в 1,4 раза продукцію етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації.

3. Вперше виявлено роль пероксисомної каталази в процесі алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантного штаму *S. cerevisiae*. Делеція гена *CTA1* призводила до обмеження приросту біомаси та зниження продукції етанолу в 2 рази при порівнянні з вихідним штамом.

4. Встановлено, що рекомбінантний штам *S. cerevisiae* здатний до катаболізму ксилози, при ферментації цієї пентози, формує в 1,8 раза більшу кількість активних форм кисню, ніж при ферментації глюкози.

5. На основі ксилозо-ферментуючого штаму *S. cerevisiae* сконструйовано штами з делецією та посиленою експресією низки генів *ADR1*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1* та *ZNF1*, що кодують транскрипційні фактори.

6. Встановлено, що делеція *HAP4* веде до зростання продукції етанолу в 1,8 раза при порівнянні з вихідним штамом та сягає 10,4 г/л етанолу при ферментації ксилози. Делеція *CAT8* призводить до збільшення накопичення етанолу в 1,1 раза порівняно з реципієнтним штамом, становлячи 6,45 г/л. Маніпуляції з геном *ZNF1* впливу на алкогольну ферментацію ксилози не виявляли. В той час як делеція *ADR1*, *ASG1*, *SIP4*, *TUP1* та посилення експресії генів *ADR1*, *CAT8*, *SIP4*, *HAP4* призводили до зниження продукції етанолу при ферментації ксилози.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- D. de Oliveira, M. E. Burton, E. Vaughan and E. J. Rykiel, "Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint," *BioScience*, vol. 55, no. 7, pp. 593-602, 2005.
- 2. T. Jeffries and Y. Jin, "Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 63, pp. 495-509, 2004.
- L. O. Ingram, P. F. Gomez, X. Lai, M. Moniruzzaman, B. Wood, L. P. Yomano, S. W. York, "Metabolic engineering of bacteria for ethanol production" *Biotechnol. Bioeng*, Vol. 58, pp. 204-214, 1998.
- T. A. Brooks, L. O. Ingram, "Conversion of mixed waste office paper to ethanol by genetically engineered *Klebsiella oxytoca* strain P2," *Biotechnol. Progr*, vol. 11, pp. 619-625, 1995.
- 5. T. Jeffries and Y. Jin, "Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts," *Adv. Appl. Microbiol*, vol. 47, pp. 221-268, 2000.
- O. B. Ryabova, O. M. Chmil, A. A. Sibirny, "Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*," *FEMS Yeast Res*, vol. 3, pp. 157-164, 2003.
- J. Ruchala, O. O. Kurylenko, N. Soontorngun, K. V. Dmytruk, A. A. Sibirny, "Transcriptional activator Cat8 is involved in regulation of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*," *Microb Cell Fact*, 2017.
- 8. T. M. Long, Y. Su, J. Headman, A. Higbee, L. B. Willis, T. W. Jeffries, "Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum,*" *Appl Env. Microbiol*, vol. 78, pp. 5492-5500, 2012.
- G. Scalcinati, J. M. Otero, J. R. Van Vleet, T. W. Jeffries, L. Olsson, J. Nielsen, "Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient aerobic xylose consumption," *FEMS Yeast Research*, vol. 12, no. 5, pp. 582-597, 2012.

- A. J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, T. Tschaplinski, "The path forward for biofuels and biomaterials," *Science*, vol. 311, pp. 484-489, 2006.
- 11. А. А. Сибірний "Біопаливний етанол з лігноцелюлози (рослинної біомаси): досягнення, проблеми, перспективи," *Вісн НАН України*, vol. 3, pp. 32-48, 2006.
- A. B. Taylor, D. P. Mocan, A. J. Bell, "Gasoline/Alcohol Blends: Exhaust Emissions, Performance and Burn-Rate in a Multi-Valve Production Engine," SAE Technical Paper, 1996.
- K. Morganti, M. Almansour, A. Khan, "Leveraging the benefits of ethanol in advanced engine-fuel systems," Energy Conversion and Management, vol. 157, pp. 480-497, 2018.
- 14. A. E. Wheals, L. C. Basso, D. M. G. Alves, H. V. Amorim, "Fuel ethanol after 25 years," *Trends in Biotechnol*, vol. 17, pp. 482-487, 1999.
- A. Wieselogel, J. Tyson, D. Johnsson, "Biomass feedstock resources and composition," Handbook on bioethanol: production and utilization, Ed. C.E. Wyman Taylor and Francis, *Washington DC*, pp. 105-118, 1996.
- 16. С. М. Шульга, О. О. Тігунова, Я. Б. Блюм, "Лігноцелюлоза як альтернативна сировина для одержання біобутанолу," *Biotechnologia acta*, vol. 6, no. 2, 2013.
- J. S. Brigham, W. S. Adney, M. E. Himmel, "Hemicelluloses: diversity and applications, Handbook on bioethanol: production and utilization," *Washington DC*, pp. 119-142, 1996.
- J. L. Alonso, H. Dominguez, G. Garrote, J. C. Parajo, M. J. Vazques, "Xylooligosaccharides: properties and production technologies," *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*, vol. 2, no. 1, pp. 230-232, 2003.
- 19. Б. М. Нахманович "Ацетоно-бутиловое брожение на гидролизатах кукурузной кочерыжки" Вопросы пищевой и бродильной микробиологии.-К.: Изд. Академии наук Украинской ССР, pp. 150-155, 1958.

- 20. T. K. Kirk, W. J. Connors, J. G. Zeikus, "Advances in understanding the microbiological degradation of lignin. The structure, biosynthesis and degradation of wood," (Plenum).- New York, pp. 369-394, 1977.
- 21. M. Dashtban, H. Schraft, T. A. Sued, W. Qin, "Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin," *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 1, pp. 36-50, 2010.
- 22. Z. Wang, D. R. Keshwani, A. P. Redding, J. J. Cheng, "Alkaline pretreatment of coastal bermudagrass for bioethanol production," ASABE Annual International Meeting, Rhode Island Convention Center Providence, Rhode Island, 2008.
- M. Laser, D. Schulman, S. G. Allen, et al. "A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol," vol. 81, pp. 33-44, 2002.
- 24. R. Arora, C. Manisseri, et al. "Monitoring and Analyzing Process Streams Towards Understanding Ionic Liquid Pretreatment of Switchgrass (*Panicum virgatum L.*)," *Bio - energ*, vol. 3, pp. 134-145, 2010.
- Z. Hua, G. A. Baker, J. V. Cowins, "Fast enzymatic saccharification of switchgrass after pretreatment with ionic liquids," *Biotechnol. Prog*, vol. 26, no. 1, pp. 127-133, 2010.
- 26. Z. Hua, Y. Wang, Z. Wen, "Alkali (NaOH) pretreatment of switchgrass by radiofrequencybased dielectric heating," *Appl. Biochem. Biotechnol*, vol. 148, pp. 71-81, 2008.
- 27. L. F. Del Rio, R. P. Chandra, J. N. Saddler, "The ease of Enzymatic hydrolysis of Organosolvpretreated softwoods," *Biores. Technol*, vol. 107, pp. 235-242, 2012.
- 28. B. K. Ahring, K. Jensen, P. Nielsen, A. B. Bjerre, A. S. Schmidt, "Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria," *Bioresource Technology*, vol. 58, no. 2, pp. 107-113, Nov. 1996.
- R. L. Howard, E. Abotsi, E. L. Jansen van Rensburg, S. Howard, "Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production," *African J. of Biotechnology*, vol. 2, pp. 602-619, 2003.

- 30. J. Olsson, V. Novy, F. Nielsen, O. Wallberg, M. Galbe, "Sequential fractionation of the lignocellulosic components in hardwood based on steam explosion and hydrotropic extraction," *Biotechnol Biofuels*, 2019.
- 31. R. F. Brown, F. K. Agbogbo, M. T. Holtzapple, "Comparison of mechanistic models in the initial rate enzymatic hydrolysis of AFEX-treated wheat straw," *Biotechnol Biofuels*, 2010.
- S. Larsson, E. Palmqvist, B. Hahn-Hagerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi,
 N. O. Nilvebrant, "The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood," *Enzyme Microb. Technol*, vol. 24, pp. 151-159, 1999.
- 33. Н. В. Борзова, Л. Д. Варбанець, "Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно-функціональні особливості," *Біотехнологія*, vol. 2, no. 2, 2009.
- 34. S. Bhat, P. W. Goodenough, E. Owen, et al., "Cellobiose: A true inducer of cellulosome in different strains of *Clostridium thermocellum*," *FEMS Microbiol*, vol. 111, pp. 73-78, 1993.
- 35. S. Jindou, Q. Xu, R. Kenig, et al., "Novel architecture of family glycoside hydrolases identified in cellulosomal enzymes of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Clostridium thermocellum*," *FEMS Microbiol*, vol. 254, no. 2, pp. 308-316, 2006.
- 36. B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, et al., "Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today," *Trends Biotechnol*, vol. 24, no. 12, pp. 549-556, 2006.
- 37. E. Aydemir, S. Demirci, A. Doğan, A. Ö. Aytekin, F. Sahin, "Genetic Modifications of Saccharomyces cerevisiae for Ethanol Production from Starch Fermentation," J Bioproces Biotech, pp. 4-7, 2014.
- 38. G. E. Cole, P. C. McCabe, D. Inlow, D. H. Gelfand, A. Ben-Bassat, et al., "Stable Expression of Aspercillus awamori Glucoamylase in Distiller's Yeast," Nat Biotechnol, vol. 6, pp. 417-421, 1988.

- 39. A. C. Rosemary, H. R. Shaunita, L. Favaro, H. Willem, "Construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for the efficient consolidated bioprocessing of raw starch," *Biotechnol Biofuels*, vol. 12, pp. 201, 2019.
- 40. C. Lucas, N. Vanuden, "Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*," *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 23, pp. 491-495, 1986.
- 41. T. Hamacher, J. Becker, M. Gardonyi, B. Hah Hagerdal, E. Boles, "Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization," *Microbiology*, vol. 148, no. 9, pp. 2783-2788, 2002.
- 42. A. Matsushika, H. Inoue, T. Kodaki, S. Sawayama, "Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives," *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 84, pp. 37-53, 2009.
- 43. M. Kuyper, M. M. Hartog, M. J. Toirkens, et al., "Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation," *FEMS Yeast Res*, vol. 5, pp. 399-409, 2005.
- 44. О. Дмитрук, К. Дмитрук, А. Вороновський, А. Сибірний, "Метаболічна інженерія початкових етапів катаболізму ксилози у дріжджів з метою конструювання ефективних продуцентів етанолу з лігноцелюлози," *Cytology and Genetics*, vol. 42, pp. 70-84, 2008.
- 45. M. H. Toivari, L. Salusjarvi, L. Ruohonen, M. Penttila, "Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 6, pp. 3681-3686, 2004.
- 46. K. Karhumaa, R. Fromanger, B. Hahn-Hägerdal, M. F. Gorwa-Grauslund, "High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 73, pp. 1039-1046, 2007.
- 47. Y. Zhang, H. Lee, "Site directed mutagenesis of the cysteine residues in the *Pichia stipitis* xylose reductase," *FEMS Microbiol. Lett*, vol. 147, no. 2, pp. 227-232, 1997.

- 48. L. Salusjärvi, S. Kaunisto, S. Holmström, "Overexpression of NADH-dependent fumarate reductase improves D-xylose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*," *J. industrial microbiology biotechnology*, vol. 40, no. 12, pp. 1383-1392, 2013.
- 49. R. Amore, C. P. Hollenberg, "Xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: primary structure of the gene and the protein," *Nucl. Acids Res*, vol. 17, no. 18, 1989.
- 50. M. Gardonyi, B. Hahn-Hagerdal, "The Streptomyces rubiginosus xylose isomerase is misfolded when expressed in Saccharomyces cerevisiae," Enzyme and Microbial. Technol, vol. 32, pp. 252-259, 2003.
- 51. M. Walfridsson, X. Bao, M. Anderlund, G. Lilius, L. Bulow, B. Hahn, "Hägerdal Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase," *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 62, pp. 4648-4651, 1996.
- 52. A. Lonn, M. Gardonyi, W. van Zyl, B. HahnHägerdal, R. C. Otero, "Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. Gene cloning and protein characterization," *Eur. J. Biochem*, vol. 269, pp. 157-163, 2002.
- 53. M. Kuyper, A. A. Winkler, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, "Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle," *FEMS Yeast Res*, vol. 4, pp. 655-664, 2004.
- 54. V. De Figueiredo, V. de Mello, V. Reis, et al., "Functional expression of *Burkholderia cenocepacia* xylose isomerase in yeast increases ethanol production from a glucose– xylose blend," *Bioresource Technology*, vol. 128, pp. 792-796, 2013.
- 55. M. Ota, H. Sakuragi, H. Morisaka, et al., "Display of *Clostridium cellulovorans* xylose isomerase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* and its direct application to xylose fermentation," *Biotechnology Progress*, vol. 29, no. 2, pp. 346-351, 2013.

- 56. Y. S. Jin, J. Cruz, T. W. Jeffries, "Xylitol production by a *Pichia tipitis* D-xylulokinase mutant," *Appl. Microbial. Biotechnol*, vol. 68, pp. 42-45, 2005.
- 57. M. Kuyper, M. M. P. Hartog, M. J. Toirkens, M. J. H. Alma Ring, A. A. Winkler, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, "Xyloseisomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation," *FEMS Yeast Res*, vol. 5, pp. 399-409, 2005.
- 58. S. Kim, J. M. Skerker, W. Kang, et al., "Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*," *PloS one*, vol. 8, no. 2, 2013.
- 59. P. H. N. Tran, J. K. Ko, G. Gong, Y. Um, S. Lee, "Improved simultaneous cofermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery," *Biotechnol Biofuels*, vol.13, no.12, 2020.
- 60. P. H. N. Tran, J. K. Ko, G. Gong, Y. Um, S. Lee, "Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain for lignocellulosic biofuel production," *Biotechnol Biofuels*, vol. 268, no. 11, 2018.
- 61. T. Cavalier-Smith, "The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts and microbodies," *Acad. Sci*, vol. 500, pp. 55-71, 1987.
- 62. A. Schluter, S. Fourcade, R. Ripp et al., "The evolutionary origin of peroxisomes: an ER–peroxisome connection," *Mol Biol Evol*, vol. 23, pp. 38-45, 2006.
- 63. T. Gabaldon, "Peroxisome diversity and evolution," *Philos Trans R Soc B: Biol Sci*, vol. 365, pp. 765-733, 2010.
- 64. L. M. Olivier, S. K. Krisans, "Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1529, pp. 89-102, 2000.
- 65. M. Schrader, H. D. Fahimi, "The peroxisome: still a mysterious organelle," *Histochem Cell Biol*, vol. 129, pp. 421-440, 2008.
- 66. M. Schrader, S. Grille, H. D. Fahimi et al., "Peroxisome interactions and cross-talk with other subcellular compartments in animal cells," In: Del Rio LA, ed.

Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism. Berlin: Springer, pp. 1-22, 2013.

- 67. C. L. Walker, L. C. D. Pomatto, D. N. Tripathi, and K. J. A. Davies, "Redox Regulation of Homeostasis and Proteostasis in Peroxisomes," *Physiol. Rev*, vol. 98, no. 1, pp. 89-115, Jan. 2018.
- 68. P. A. Michels, J. Moyersoen, H. Krazy et al., "Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes (review)," *Mol Membr Biol*, vol. 22, pp. 133-145, 2005.
- 69. S. D. Kohlwein, M. Veenhuis, I. J. van der Klei, "Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat- store em up or burn em down," *Genetics*, vol. 193, pp. 1-50, 2013.
- 70. P. A. Michels, J. Moyersoen, H. Krazy, N. Galland, M. Herman, V. Hannaert, "Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes (review)," *Mol. Membr. Biol*, vol. 22, pp. 133-145, 2005.
- 71. M. Schrader, H. D. Fahimi, "The peroxisome: still a mysterious organelle," *Histochem Cell Biol*, vol. 129, pp. 421-440, 2008.
- 72. E. B. Aksam, B. de Vries, I. J. van der Klei, J. A. Kiel, "Preserving organelle vitality: peroxisomal quality control mechanisms in yeast," *FEMS Yeast Res*, vol. 9, pp. 808-820, 2009.
- 73. M. Bartoszewska, L. Opalinski, M. Veenhuis et al., "The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi," *Biotechnol Lett*, vol. 33, pp. 1921-31, 2011.
- 74. P. Magliano, M. Flipphi, D. Sanglard et al., "Characterization of the *Aspergillus nidulans* biotin biosynthetic gene cluster and use of the bioDA gene as a new transformation marker," *Fungal Genet Biol*, vol. 48, pp. 208-15, 2011.
- 75. Y. Tanabe, J. Maruyama, S. Yamaoka et al., "Peroxisomes are involved in biotin biosynthesis in Aspergillus and Arabidopsis," Biol Chem, vol. 286, pp. 30455-61, 2011.

- 76. J. Moyersoen, J. Choe, E. Fan et al., "Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target," *FEMS Microbiol Rev*, vol. 28, pp. 603-43, 2004.
- 77. R. J. Wanders, H. R. Waterham, "Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1763, pp. 1707-20, 2006.
- 78. I. J. van der Klei, H. Yurimoto, Y. Sakai, and M. Veenhuis, "The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*, vol. 1763, no. 12, pp. 1453-1462, Dec. 2006.
- M. Veenhuis, J. P. van Dijken, W. Harder, "The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeasts," *Adv. Microb. Physiol*, vol. 24, pp. 1-82, 1983.
- 80. C. W. van Roermund, H. R. Waterham, L. Ijlst et al., "Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*," *Cell Mol Life Sci*, vol. 60, pp. 1838-51, 2003.
- 81. M. Kunze, I. Pracharoenwattana, S. M. Smith et al., "A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1763, pp. 1441-52, 2006
- 82. J. Freitag, J. Ast, M. Bolker, "Cryptic peroxisomal targeting via alter- native splicing and stop codon read-through in fungi," *Nature*, vol. 485, pp. 522-5, 2012.
- P. Kabran, T. Rossignol, C. Gaillardin et al., "Alternative splicing regulates targeting of malate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*," *DNA Res*, vol. 19, pp. 231-44, 2012.
- 84. K. Strijbis, J. van den Burg, W. F. Visser et al., "Alternative splicing directs dual localization of *Candida albicans* 6- phosphogluconate dehydrogenase to cytosol and peroxisomes," *FEMS Yeast Res*, vol. 8, pp. 12-61.
- 85. D. J. Jamieson, "Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 16, pp. 14-27, 1998.
- 86. H. Horiguchi, H. Yurimoto, N. Kato et al., "Antioxidant system within yeast peroxisome. Biochemical and physiological characterization of CbPmp20 in the

methylotrophic yeast *Candida boidinii*," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 17, pp. 14279-88, 2001.

- 87. L. Barreto, A. Garcera, K. Jansson et al., "A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is functionally related to sulfur amino acid metabolism," *Eukaryot Cell*, vol. 5, pp.1748-59, 2006.
- H. Russmayer. et al., "Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle," *BMC Biol*, pp. 13-80, 2015.
- 89. S. R. Abdelraheim, J. L. Cartwright, L. Gasmi et al., The NADH diphosphatase encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* NPY1 nudix hydrolase gene is located in peroxisomes," *Arch Biochem Biophys*, vol. 388, pp. 18-24, 2001.
- 90. J. L. Cartwright, L. Gasmi, D. G. Spiller et al., "The Saccharomyces cerevisiae PCD1 gene encodes a peroxisomal nudix hydrolase active toward coenzyme A and its derivatives," J Biol Chem, vol. 275, pp. 32925-30, 2000.
- 91. G. H. Luers, R. Advani, T. Wenzel et al.,"The *Pichia pastoris* dihydroxyacetone kinase is a PTS1-containing, but cytosolic, protein that is essential for growth on methanol," *Yeast*, vol. 14, pp. 759-71, 1998.
- H. Rußmayer, M. Buchetics, C. Gruber et al., "Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle," *BMC Biol*, pp. 13-80, 2015.
- O. Kurylenko, M. Semkiv, J. Ruchala et al., "New approaches for improving the production of the 1st and 2nd generation ethanol by yeast," *Acta Biochim Pol*, vol. 63, pp. 31-8, 2016.
- 94. G. J. Gatto, B. V. Geisbrecht, S. J. Gould, J. M. Berg, "Peroxisomal targeting signal recognition by the TPR domains of human *PEX5*," *Nat. Struct. Biol*, vol. 7, pp. 1091-1095, 2000.
- F. D. Mast, A. Fagarasanu, B. Knoblach, R. A. Rachubinski,"Peroxisome biogenesis: something old, some thing new, something borrowed," *Physiology*, (Bethesda), 2010.

- 96. T. Lanyon Hogg, S. L. Warriner, A. Baker, "Getting a camel through the eye of a needle: the import of folded proteins by peroxisomes," *Biol. Cell*, vol. 102, pp. 245-263, 2010.
- 97. S. Nagotu, M. Veenhuis, I. J. van der Klei, "Divide et impera: the dictum of peroxisomes," *Traffic*, vol. 11, pp. 175-184, 2010.
- 98. P. K. Kim, R. T. Mullen, U. Schumann, J. Lippincott Schwartz, "The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo *PEX16* dependent pathway from the ER," *J. Cell Biol*, vol. 173, pp. 521-532, 2006.
- V. I. Titorenko, J. J. Smith, R. K. Szilard, R. A. Rachubinski, "Peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*," *Cell Biochem. Biophys*, vol. 32, pp. 21-26, 2000.
- 100. C. Ma, G. Agrawal, and S. Subramani, "Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis," *J. Cell Biol*, vol. 193, no. 1, pp. 7-16, Apr. 2011.
- 101. А. А. Сибірний, "Молекулярні механізми біогенезу пероксисом у дріжджів," *Молекулярная биология*, vol.46, no. 1, pp. 14-30, 2012.
- 102. D. Kerssen, E. Hambruch, W. Klaas, H. W. Platta, B. de Kruijff, R. Erdmann, W. H. Kunau, W. Schliebs, "Membrane association of the cycling peroxisome import receptor Pex5p," *J. Biol. Chem*, vol. 281, pp. 27003-27015, 2006.
- 103. J. M. Jones, J. C. Morrell, S. J. Gould, "PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins," J. Cell Biol, vol. 164, pp. 57-67, 2004.
- 104. M. Otzen, D. Y. Wang, M. G. J. Lunenborg, I. J. van der Klei, "Hansenula polymorpha Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2)," J. Cell Sci, vol. 118, pp. 3409-3418, 2005.
- 105. H. Einwachter, S. Sowinski, W. H. Kunau, W. Schliebs, "Yarrowia lipolytica Pex20p, Saccharomyces cerevisiae Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL full a common function in the early steps of the peroxisomal PTS2 import pathway," *EMBO Rep*, vol. 2, pp. 1035-1039, 2001.

- 106. K. Gunkel, R. van Dijk, M. Veenhuis, I. J. van der Klei, "Routing of Hansenula polymorpha alcohol oxidase: an alternative peroxisomal proteinsorting machinery," *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, pp. 1347-1355, 2004.
- 107. G. Agrawal and S. Subramani, "Emerging role of the endoplasmic reticulum in peroxisome biogenesis," *Front. Physiol*, vol. 4, p. 286, 2013.
- 108. V. I. Titorenko, R. A. Rachubinski, "Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in perox isome biogenesis," *Mol. Cell Biol*, vol. 18, pp. 2789-2803, 1998.
- 109. H. W. Platta, R. Erdmann, "Peroxisomal dynamics," *Trends Cell Biol*, vol. 17, pp. 474-484, 2007.
- 110. J. C. Farré, et. all., "A New Yeast Peroxin, Pex36, a Functional Homolog of Mammalian *PEX16*, Functions in the ER-to-Peroxisome Traffic of Peroxisomal Membrane Proteins," *J Mol Biol*, vol. 429, no. 23, pp. 3743-3762, 2017.
- 111. D. M. Nair, P. E. Purdue, P. B. Lazarow, "Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Cell Biol*, vol. 167, pp. 599-604, 2004.
- 112. F. J. Vizeacoumar, J. C. TorresGuzman, D. Bouard, J. D. Aitchison, R. A. Rachubinski, "Pex30p, Pex31p, and Pex32p form a family of peroxisomal in tegral membrane proteins regulating peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, pp. 665-677, 2004.
- 113. F. J. Vizeacoumar, J. C. Torres-Guzman, Y.Y. Tam, J. D. Aitchison, R. A. Rachubinski, "YHR150w and YDR479c encode peroxisomal integral membrane proteins involved in the regulation of peroxisome number, size, and distribution in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Cell Biol*, vol. 161, pp. 321-332, 2003.
- 114. A. D. Mozdy, J. M. McCaffery, J. M. Shaw, "Dnm1p GTP asemediated mitochondrial fission is a multistep process requiring the novel integral mem brane component Fis1p," *J. Cell Biol*, vol. 151, pp. 367-380, 2000.
- 115. E. Kurbatova, M. Otzen, I. J. van der Klei, "p24 proteins play a role in peroxisome proliferation in yeast," *FEBS Lett*, vol. 583, pp. 3175–3180, 2009.
- 116. M. Otzen, A. M. Krikken, P. Z. Ozimek, E. Kurbatova, S. Nagotu, M. Veenhuis I. J. van der Klei, "In the yeast *Hansenula polymorpha*, peroxisome formation from the ER is independent of Pex19p, but involves the function of p24 proteins," *FEMS Yeast Res*, vol. 6, pp. 1157-1166, 2006.
- 117. A. Fagarasanu, F. D. Mast, B. Knoblach et al., "Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 11, pp. 644-54, 2010.
- 118. A. Fagarasanu, M. Fagarasanu, G. A. Eitzen et al., "The peroxisomal membrane protein Inp2p is the peroxisome-specific receptor for the myosin V motor Myo2p of *Saccharomyces cerevisiae*," *Dev Cell*, vol. 10, pp. 587-600, 2006.
- 119. A. Fagarasanu, F. D. Mast, B. Knoblach et al., "Myosin-driven peroxisome partitioning in *S. cerevisiae*," *J Cell Biol*, vol. 186, pp. 541-54, 2009.
- 120. M. Fagarasanu, A. Fagarasanu, Y. Y. Tam et al., "Inp1p is a peroxisomal membrane protein required for peroxisome inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*," *J Cell Biol*, vol. 169, pp. 765-75, 2005.
- 121. B. Knoblach, X. Sun, N. Coquelle et al., "An ER–peroxisome tether exerts peroxisome population control in yeast," *EMBO J*, vol. 32, pp. 2439-53, 2013.
- 122. D. Hoepfner, D. Schildknegt, I. Braakman et al., "Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation," *Cell*, vol. 122, pp. 85-95, 2005.
- 123. S. Thoms, I. Harms, K. U. Kalies et al., "Peroxisome formation requires the endoplasmic reticulum channel protein Sec 61," *Traffic*, vol. 13, pp. 599-609, 2012.
- 124. M. Schrader, L. F. Godinho, J. L. Costello et al., "The different facets of organelle interplay-an overview of organelle interactions," *Front Cell Dev Biol*, vol. 3, no. 56, 2015.
- 125. M. Conrad, J. Schothorst, H. N. Kankipati, G. Van Zeebroeck, M. Rubio-Texeira, J. M. Thevelein, "Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Microbiology Reviews*, 2014.
- 126. K. M. Choi, Y. Y. Kwon, C. K. Lee, "Disruption of Snf3/Rgt2 glucose sensors decreases lifespan and caloric restriction effectiveness through Mth1/Std1 by

adjusting mitochondrial efficiency in yeast," *FEBS Letters*, vol. 589, no. 3, pp. 349-357, 2014.

- 127. H. Moriya, M. Johnston, "Glucose sensing and signaling in Saccharomyces cerevisiae through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase," I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 101, pp. 1572-1577, 2004.
- 128. K. M. Flick, N. Spielewoy, T. I. Kalashnikova, M. Guaderrama, Q. Zhu, H. C. Chang, C. Wittenberg, "Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT* gene promoters," *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, pp. 3230-3241, 2003.
- 129. A. Palomino, P. Herrero, F. Moreno, "Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae HXK2* promoter," *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no. 5, pp. 1427-38, Mar. 2006.
- 130. A. Roy, Y. B. B. Kim, K. H. Cho, J. H. H. Kim, "Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj*, vol. 1840, no. 9, pp. 2878-2885, Sep. 2014.
- 131. O. V. Dmytruk, K. V. Dmytruk, A. Y. Voronovsky, A. A. Sibirny, "Metabolic engineering of the initial stages of xylose catabolism in yeast for the purpose of constructing efficient producers of ethanol from lignocellulosics," *Cytology and Genetics*, vol. 42, no. 2, pp.127-138, 2008.
- 132. F. Rolland, J. Winderickx, J. M. Thevelein, "Glucose-sensing and-signalling mechanisms in yeast," *FEMS Yeast Res*, vol. 2, no. 2, pp. 183-201, 2002.
- 133. Z. Lobo, P. K. Maitra, "Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*," *Arch. Biochem. Biophys*, vol. 182, pp. 639-645, 1977.
- 134. J. M. Gancedo "Yeast carbon catabolite repression," *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, vol. 62, no. 2, pp. 334-361, 1998.
- 135. Z. Feng, S. E. Wilson, Z. Y. Peng, K. K. Schlender, E. M. Reiman, R. J. Trumbly, "The yeast *GLC7* gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase," *J. Biol. Chem*, vol. 266, pp. 23796-23801, 1991.

- 136. J. Tu, M. Carlson, "*REG1* binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*," *EMBO J*, vol. 14, pp. 5939-5946, 1995.
- 137. M. Lundin, J. O. Nehlin, H. Ronne, "Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein *MIG1*," *Mol. Cell. Biol*, vol. 14, pp. 1979-1985, 1994.
- 138. J. Ostling, M. Carlberg, H. Ronne, "Functional domains in the Mig1 repressor," *Mol. Cell. Biol*, vol.16, pp. 753-761, 1996.
- 139. J. Schultz, M. Carlson, "Molecular analysis of SSN6, a gene functionally related to SNF1 protein kinase of Saccharomyces cerevisiae," Mol. Cell. Biol, vol. 7, pp. 3637-3645, 1987.
- 140. R. J. Trumbly, "Cloning and characterization of the *CYC8* gene mediating glucose repression in yeast," *Gene*, vol. 73, pp. 97-111, 1988.
- 141. R. S. Sikorski, M. S. Boguski, M. Goebl, P. Hieter, "A repeating aminoacid motif in *CDC23* defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis," *Cell*, vol. 60, pp. 307-317, 1990.
- 142. K. Komachi, M. J. Redd and A. D. Johnson, "The WD repeats of Tup1 interact with the homeodomain protein alpha 2," *Genes Dev*, vol. 8, pp. 2857-2867, 1994.
- 143. F. E. Williams and R. J. Trumbly, "Characterization of *TUP1*, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Biol*, vol. 10, pp. 6500-6511, 1990.
- 144. D. Tzamarias and K. Struhl, "Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex," *Nature*, (London), vol. 369, pp. 758–760, 1994.
- 145. F. E. Williams, U. Varanasi and R. J. Trumbly, "The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in Saccharomyces cerevisiae are associated in a protein complex," Mol. Cell. Biol, vol. 11, pp. 3307-3316, 1991.
- 146. U. A. Varanasi, M. Klis, P. B. Mikesell, R. J. Trumbly, "The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits," *Mol. Cell. Biol*, vol. 16, pp. 6707-6714, 1996.

- 147. C. A. Keleher, M. J. Redd, J. Schultz, M. Carlson, A. D. Johnson, "Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast," *Cell*, vol. 68, pp.709–719, 1992.
- 148. D. G. Edmondson, M. M. Smith, S. Y. Roth, "Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4," *Genes Dev*, vol. 10, pp. 1247-1259, 1996.
- 149. M. A. Treitel, M. Carlson, "Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein," Proc. Natl. Acad. Sci, USA, vol. 92, pp. 3132-3136, 1995.
 - 150. J. L. Celenza, and M. Carlson, "A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase," *Science*, vol. 233, pp. 1175-1180, 1986.
 - 151. P. Sanz, G. R. Alms, T. A. Haystead, M. Carlson, "Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase," *Mol. Cell. Biol*, vol. 20, no. 4, pp. 1321-8, Feb. 2000
 - 152. K. D. Entian, F. K. Zimmermann, "New genes involved in catabolite repression and derepression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Bacteriol*, vol. 151, pp. 1123-1128, 1982.
 - 153. L. Neigeborn, M. Carlson, "Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in Saccharomyces cerevisiae," Genetics, vol. 108, pp. 845-858, 1984.
 - 154. J. R. Erickson and M. Johnston, "Genetic and molecular characterization of *GAL83*: its interaction and similarities with other genes involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 135, pp. 655–664, 1993.
 - 155. V. K. Vyas, S. Kuchin, M. Carlson, "Interaction of the Repressors Nrg1 and Nrg2 With the Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*," Genetics, vol. 158, pp. 563-572, 2001.
 - 156. J. Franceois, M. E. Villanueva and H. G. Hers, "The control of glycogen metabolism in yeast. 1. Interconversion in vivo of glycogen synthase and glycogen

phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or uncouplers," *Eur J Biochem*, vol. 174, pp. 551-559, 1988.

- 157. B. D. Gomperts, I. M. Kramer, P. E. R. Tatham, "Signal Transduction," *Academic Press*, 2003.
- 158. J. B. van der Plaat, "Cyclic 38,58-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast," *Biochem. Biophys. Res. Commun*, vol. 56, pp. 580-587, 1974.
- 159. T. Toda, S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, M. Wigler, "Three different genes in S. *cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase," *Cell*, vol. 50, no. 2, pp. 277-287, 1987.
- 160. L. Kraakman, K. Lemaire, P. Ma, A. W. R. H. Teunissen, M. C. V. Donaton, P. Van Dijck, J. M. Thevelein, "A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose," *Molecular Microbiology*, vol. 32, no. 5, pp. 1002-1012, 1999.
- 161. H. Mitsuzawa, I. Uno, T. Oshima, T. Ishikawa, "Isolation and characterization of temperature-sensitive mutations in the *RAS2* and *CYR1* genes of *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 123, no. 4, pp. 739-48, 1989.
- 162. P. Van Dijck, P. Ma, M. Versele, M. F. Gorwa, S. Colombo, K. Lemaire, D. Bossi, A. Loïez, J. M. Thevelein, "A baker's yeast mutant (fill) with a specific, partially inactivating mutation in adenylate cyclase maintains a high stress resistance during active fermentation and growth," *J Mol Microbiol Biotechnol*, vol. 2, no. 4, pp. 521-30, 2000.
- 163. F. Rolland, J. H. De Winde, K. Lemaire, E. Boles, J. M. Thevelein, J. Winderickx, "Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinasedependent sensing process," *Mol. Microbiol*, vol. 38, pp. 348-358, 2000.
- 164. K. Tanaka, M. Nakafuku, T. Satoh, M. S. Marshall, J. B. Gibbs, K. Matsumoto, Y. Kaziro, A. Toh-e, *Cell*, vol. 60, pp. 803-807, 1990.

- 165. J. M. Thevelein, "Signal transduction in yeast," Yeast, vol.10, pp. 1753-1790, 1994.
- 166. E. Shelest, "Transcription factors in fungi," *FEMS, Microbiol Lett*, vol. 286, no. 2, pp. 145-151, 2008.
- 167. M. Watanabe, D. Watanabe, T. Akao, H. Shimoi, "Overexpression of *MSN2* in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing," *J Biosci Bioeng*, vol. 107, pp. 516–518, 2009.
- 168. S.-S. Vamvakas, & J. Kapolos, "Factors affecting yeast ethanol tolerance and fermentation efficiency," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 36, no. 8, 2020.
- 169. N. I. Vargas-Maya, G. A. González-Hernández, I. E. Padilla-Guerrero, & J. C. Torres-Guzmán, "Overexpression of smORF YNR034W-A/EGO4 in Saccharomyces cerevisiae increases the fermentative efficiency of Agave tequilana," Weber must. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, vol. 44(1), pp. 63-74, 2016.
- 170. E. Durchschlag, W. Reiter, G. Ammerer, C. Schüller, "Nuclear localization destabilizes the stress-regulated transcription factor Msn2," *J Biol Chem*, vol. 279, pp.55425–55432, 2004.
- 171. S. Buschlen, J-M Amillet, B. Guiard, A. Fournier, C. Marcireau, M. Bolotin-Fukuhara, "The *S.cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression," *Comp Funct Genom*, vol. 4, pp. 37–46, 2003.
- 172. N. Petryk, Y.-F. Zhou, K. Sybirna, M.-H. Mucchielli, B. Guiard, W.-G. Bao, O.V. Stasyk, O.G. Stasyk, O.S. Krasovska, K. Budin, N. Reymond, S. Imbeaud, S. Coudouel, H. Delacroix, A. Sibirny, M. Bolotin-Fukuhara, "Functional Study of the Hap4-Like Genes Suggests That the Key Regulators of Carbon Metabolism HAP4 and Oxidative Stress Response YAP1 in Yeast Diverged from a Common Ancestor," *PLoS ONE*, 9, 2014.

- 173. A. Bergman, D. Vitay, J. Hellgren, Y. Chen, J. Nielsen, & V. Siewers. "Effects of overexpression of STB5 in *Saccharomyces cerevisiae* on fatty acid biosynthesis, physiology and transcriptome," *FEMS Yeast*, 2019.
- 174. J. Hong, S.-H. Park, S. Kim, S.-W. Kim, & J.-S. Hahn. "Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by enzyme engineering and increasing membrane flexibility and NAPDH production," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018.
- 175. S.-H. Park, K. Lee, J. W. Jang, & J.-S. Hahn. "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of shinorine, a sunscreen material, from xylose," *ACS Synthetic Biology*, 2018.
- 176. C. Yanqing, Q. Xianni, Q. Qi, L. Yuping, W. Zhengxiang, W. Qinhong, "Effect of *MIG1* and *SNF1* deletion on simultaneous utilization of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*," *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, vol. 34(1), pp. 54-67, 2018.
- 177. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *J. Biol. Chem*, vol. 193, no. 1, pp. 265–75, Nov. 1951.
- 178. M. M. Zhang, X. Q. Zhao, C. Cheng, F. W. Bai, "Improved growth and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid by overexpression of *SET5* and *PPR1*," *Biotechnology Journal*, vol. 10, no. 12, pp. 1903-1911, 2015.
- 179. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," *Cold Spring Harb. Lab*, vol. 3, p. 2344, 2001.
- R. D. Gietz, R. A. Woods, "Transformation of yeast by lithium acetate/single stranded carrier DNA/polyethylene glycol method," *Methods in Enzymology*, pp. 87–96, 2002.
- 181. L. Wenning, T. Yu, F. David, J. Nielsen, V. Siewers, "Establishing very long-chain fatty alcohol and wax ester biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 114, no. 5, pp. 1025-1035, 2017.

- 182. C. Taxis, M. Knop, "System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnique*, vol. 40, no. 1, pp. 73–78, 2006.
- 183. L. Dzanaeva, J. Ruchala, A. Sibirny, K. Dmytruk, "The impact of transcriptional factors Znf1 and Sip4 on xylose alcoholic fermentation in recombinant strains of yeast Saccharomyces cerevisiae," Cytology and Genetics, vol.54, no.5, pp. 386-392, 2020.
- 184. E. D. Jensen, R. Ferreira, T. Jakočiūnas, D. Arsovska, J. Zhang, L. Ding and J. D. Keasling, "Transcriptional reprogramming in yeast using dCas9 and combinatorial gRNA strategies," *Microbial Cell Factories*, vol. 16, no. 1, p. 46, 2017.
- 185. R. Ferreira, P. G. Teixeira, M. Gossing, F. David, V. Siewers and J. Nielsen, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for overproduction of triacylglycerols," *Metabolic Engineering Communications*, vol. 6, pp. 22–27, 2018.
- 186. A. A. Sibirny, "Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities," *FEMS Yeast Research*, vol. 16, no. 4, 2016.
- 187. S. R. Kim, J. M. Skerker, W. Kang, A. Lesmana, N. Wei, A. P. Arkin, Y. S. Jin, "Rational and evolutionary engineering approaches uncover as small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, e57048, 2013.
- 188. A. A. Sibirny, "Molecular mechanisms of peroxisome biogenesis in yeasts," Mol Biol., vol. 46, pp. 11–26, 2012.
- 189. E. H. Hettema, W. Girzalsky, M. van den Berg, R. Erdmann, B. Distel, "Saccharomyces cerevisiae Pex3p and Pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins," *EMBO J*, vol. 19, pp. 223-233, 2000.
- 190. A. Gurvitz, et al., "Saccharomyces cerevisiae Adr1p governs fatty acid betaoxidation and peroxisome proliferation by regulating *POX1* and *PEX11*," J Biol Chem, vol. 276, no. 34, pp. 31825-30, 2001.

- 191. Л. Г. Нетюхайло, С. В. Харченко, "Активні форми кисню," Young Scientist, vol. 9, no. 12, 2014.
- 192. G. Cohen, et al., "Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the cta1 mutation," *Mol Gen Genet*, vol. 200, no. 1, pp. 74-9, 1985.
- 193. A. Nandi, L. -Jun. Yan, Ch. K. Jana, N. Das, "Role of Catalase in Oxidative Stressand Age-Associated Degenerative Diseases," *Oxid. Med. Cell Longev*, vol. 11, Nov. 2019.
- 194. R. J. Tower, A. Fagarasanu, J. D. Aitchison and R. A. Rachubinski, "The peroxin Pex34p functions with the Pex11 family of peroxisomal divisional proteins to regulate the peroxisome population in yeast," *Molecular Biology of The Cell*, vol. 22, no. 10, pp. 1727-1738, 2011.
- 195. Y. J. Zhou, N. A. Buijs, Z. Zhu, D. O. Gómez, A. Boonsombuti, V. Siewers, J. Nielsen, "Harnessing yeast peroxisomes for biosynthesis of fatty-acid-derived biofuels and chemicals with relieved side-pathway competition," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 138, no. 47, pp. 15368-15377, 2016.
- 196. L. Dzanaeva, B. Kruk, J. Ruchala, J. Nielsen, A. Sibirny, K. Dmytruk, "The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*," *Cell Biology International*, vol. 44, no. 8, pp. 1606-1615, 2020.
- 197. L. Dzanaieva, "The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*," Conference of young scientists of Institute of Cell Biology, Lviv, Ukraine, May 2019.
- 198. S. MacPherson, M. Larochelle, B. Turcotte, "A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins," *Microbiology and molecular biology reviews*, vol. 70, pp. 583-604, 2006
- 199. P. Tangsombatvichit, M. V. Semkiv, A. A. Sibirny, L. T. Jensen, K. Ratanakhanokchai, N. Soontorngun, "Zinc cluster protein Znf1, a novel transcription factor of non-fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Research*, vol. 15, no. 2, 2015.

- 200. B. Akache, K. Wu, B. Turcotte, "Phenotypic analysis of genes encoding yeast zinc cluster proteins," *Nucleic Acids Res*, vol. 29, pp. 2181-90, 2001.
- 201. D. G. Edmondson, M. M. Smith, S. Y. Rothm, "Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4," *Genes development*, vol. 15, no. 10, pp. 1247-1259, 1996.
- 202. K. Komachi, & A. D. Johnson, "Residues in the WD repeats of Tup1 required for interaction with alpha2," *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), 6023–6028
- 203. M. Huang, Z. Zhou, & S. J. Elledge, "The DNA Replication and Damage Checkpoint Pathways Induce Transcription by Inhibition of the Crt1 Repressor," *Cell*, 94(5), 595–605, 1998.
- 204. M. Proft, "Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress," *The EMBO Journal*, 20, 5, 1123–1133, 2001.
- 205. S. Jansuriyakul, P. Somboon, N. Rodboon, O. Kurylenko, A. Sibirny, N. Soontorngun, "The zinc cluster transcriptional regulator Asg1 transcriptionally coordinates oleate utilization and lipid accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 10, pp. 4549-60, 2016.
- 206. O Vincent, M Carlson, "Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4," *The EMBO Journal*, vol. 18, no. 23, pp. 6672-81, 1999.
- 207. O. Vincent, M. Carlson, "Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes," *EMBO J*, vol. 17, no. 23, pp. 7002-8, 1998.
- 208. M. Simon, G. Adam, W. Rapatz, W. Spevak, H. Ruis, "The *Saccharomyces cerevisiae ADRI* gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins," *Molecular and cellular biology*, vol. 11, no. 9, pp. 699-704, 1991.
- 209. E. T. Young, K. M. Dombek, C. Tachibana, and T. Ideker, "Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8," *J. Biol. Chem*, vol. 278, no. 28, pp. 26146–58, Jul. 2003.

- 210. E. T. Young, K. M. Dombek, C. Tachibana, T. Ideker, "Multiple pathways are coregulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8," *J Biol Chem*," vol. 278, no. 28, pp. 26146-58, 2003.
- 211. V. Haurie, M. Perrot, T. Mini, P. Jenö, F. Sagliocco, H. Boucherie, "The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*," J. Biol. Chem, vol. 276. pp.76-85, 2001.
- 212. D. Hedges, M. Proft, K. D. Entian, "CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast Saccharomyces cerevisiae," Mol. Cell. Biol, vol. 15, pp. 1915–1922, 1995.
- 213. D. Watanabe, N. Hashimoto, M. Mizuno, Y. Zhou, T. Akao, H. Shimoi, "Accelerated alcoholic fermentation caused by defective gene expression related to glucose derepression in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biosci. Biotechnol. Biochem*, vol. 77, no. 11, pp. 2255-2262, 2013.
- 214. J. L. DeRisi, V. R. Iyer, P. O. Brown, "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale," *Science*, vol. 278, pp. 680–6, 1997.
- 215. A. Matsushika, & T. Hoshino, "Increased ethanol production by deletion of HAP4 in recombinant xylose-assimilating Saccharomyces cerevisiae," Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, vol. 42, no. 12, pp. 1623-31, 2015.
- 216. L. S. Dzanaieva, K. V. Dmytruk, A. A. Sibirny, "Transcriptional factor Cat8 is involved in regulation of xylose fermentation in engineered *Saccharomyces cerevisiae*," *Фактори експерементальної еволюції організмів*, vol. 22. pp. 329-334, 2018.
- 217. L. S. Dzanaieva, O. O. Kurylenko, K. V. Dmytruk, A. A. Sibirny, "Construction of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strains capable of converting xylose into ethanol," 7th International Weigl Conference, September 26-29, Lviv, Ukraine, Book of Abstracts, 2017.
- 218. L. Dzanaieva, K. Dmytruk, A. Sibirny, "Effect of deletion of transcription factors on xylose fermentation performants of engineered *Saccharomyces cerevisiae*,"

Conference of young scientists of Institute of Cell biology, Lviv, Ukraine, May 31, 2018.

- 219. L. Dzanaieva, K. Dmytruk, A. Sibirny, "Effect of deletion of transcription factors on xylose fermentation performants of engineered *Saccharomyces cerevisiae*," Nonconventional Yeasts: from Basic Research to Application, p. 74, 2018.
- 220. L. Dzanaieva, K. Dmytruk, A. Sibirny, "The role of transcription factors in xylose fermentation of engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae*," 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, Ukraine, June 18-21, 2019.
- 221. M. Wu. Wang, H. Huo, "Life-cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types," *Environmental Research Letters*, vol. 2, pp. 1-13, 2007.
- 222. J. M. da Silva, K. C. Ribeiro, G. H. Teles, E. Ribeiro, M. A. de Morais Junior, W. de B. Pita, "Fermentation profiles of the yeast *Brettanomyces bruxellensis* in d-xylose and 1-arabinose aiming its application as a second-generation ethanol producer," vol. 37, no. 11, pp. 597-608, *Yeast*, Nov. 2020.
- 223. J. M. Silva, K. C. Ribeiro, G. H. Teles, E. Ribeiro, M. A. Morais Junior and W. B. Pita, "Fermentation profiles of the yeast *Brettanomyces bruxellensis* in D-xylose and L-arabinose aiming its application as a second-generation ethanol producer," *Yeast*, vol. 37, pp. 597-608, 2020.
- 224. C. C. Geddes, I. U. Nieves, L. O. Ingram, "Advances in ethanol production," *Current opinion biotechnology*, vol. 22, no. 3, pp. 312-319, 2011.
- 225. S. R. Kim, J. M. Skerker, W. Kang, A. Lesmana, N. Wei, A. P. Arkin, Y.-S. Jin, "Rational and Evolutionary Engineering Approaches Uncover a Small Set of Genetic Changes Efficient for Rapid Xylose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*," vol.8, no.2, 2013.
- 226. G. Jingping, S. Hongbing, S. Gang, L. Hongzhi, P. Wenxiang, "A genome shuffling-generated *Saccharomyces cerevisiae* isolate that ferments xylose and

glucose to produce high levels of ethanol," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, vol. 39. pp. 777–787, 2012.

- 227. O. O. Kurylenko, J. Ruchala, R. V. Vasylyshyn, O. V. Stasyk, O. V. Dmytruk, K. V. Dmytruk, A. A. Sibirny, "Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*," *Biotechnology for Biofuels*, vol. 11, 2018.
- 228. R. J. A. Wanders, M. Kos, B. Roest, A. J. Meijer, G. Schrakamp, H. S. A. Heymans, and J. M. Tager. "Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(3), 1054–1061, 1984.
- 229. P. Songdech, J. Ruchala, M. V. Semkiv, L. T. Jensen, A. Sibirny, K. Ratanakhanokchai, & N. Soontorngun, "Overexpression of Transcription Factor *ZNF1* of Glycolysis Improves Bioethanol Productivity under High Glucose Concentration and Enhances Acetic Acid Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnology*, vol. 15, no. 7, e1900492, 2020.
- 230. X. Lin, C. Y. Zhang, X. W. Bai, H. Y. Song, & D. G. Xiao, "Effects of *MIG1*, *TUP1* and *SSN6* deletion on maltose metabolism and leavening ability of baker's yeast in lean dough," *Microbial Cell Factories*, vol. 13, no. 93, 2014.
- 231. K. S. Lee, M. E. Hong, S. C. Jung, S. J. Ha, B. J. Yu, H. M. Koo, & Y. S. Jin, "Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 108, no. 3, 621-31, 2011.
- 232. J. Wu, X. Chen, L. Cai, L.Tang and L. Liu, Transcription factors Asg1p and Hal9p regulate pH homeostasis in *Candida glabrata*, Front. Microbiol.,2015.
- 233. D. G. Ramos, A. R. G. de Vries, S. S. Grijseels, M. C van Berkum, S. Swinnen, M. van den Broek, E. Nevoigt, J.-Marc G Daran, J. T Pronk, A. J A van Maris, A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid

tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations, *Biotechnol Biofuels*, vol.12, no.9, pp.173, 2016.

- 234. Y. S. Jin, J. M. Laplaza, & T. W. Jeffries, "Saccharomyces cerevisiae engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response," Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, no. 11, pp. 6816-6825, 2004.
- 235. A. M. Souto-Maior, D. Runquist, & B. Hahn-Hägerdal, "Crabtree-negative characteristics of recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnology*, vol. 143, no. 2, pp. 119-123, 2009.
- 236. N. Q. Shi, B. Davis, F. Sherman, J. Cruz, & T. W. Jeffries, "Disruption of the cytochrome c gene in xylose-utilizing yeast *Pichia stipitis* leads to higher ethanol production," *FEMS Yeast Research*, vol. 15, no.11, pp.1021-1030, 1999.
- 237. B. Peng, Y. Shen, X. Li, X. Chen, J. Hou, & X. Bao, "Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*," *Metabolic Engineering*, vol. 14, no. 1, pp. 9-18, 2012.
- 238. A. Matsushika, T. Goshima, & T. Hoshino, "Transcription analysis of recombinant industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals the molecular basis for fermentation of glucose and xylose," *Microbial Cell Factories*, vol. 13, no. 16, 2014.
- 239. A. J. van Maris, B. M. Bakker, M. Brandt, A. Boorsma, M. J. T. de Mattos, L. A. Grivell, & J. Blom, "Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of *HAP4* in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Research*, vol. 1, no. 2, pp. 139-149, 2001.
- 240. D. Dikicioglu, P. Pir, Z. I. Onsan, K. O. Ulgen, B. Kirdar, & S. G. Oliver, "Integration of metabolic modeling and phenotypic data in evaluation and improvement of ethanol production using respiration-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 18, pp.5809-16, 2008.

- 241. K. Qi, J. J. Zhong, & X. X. Xia, "Triggering respirofermentative metabolism in the crabtree-negative yeast *Pichia guilliermondii* by disrupting the *CAT8* gene," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 80, no. 13, pp. 3879-87, 2014.
- 242. M. C. López and H. V. Baker, "Understanding the growth phenotype of the yeast gcr1 mutant in terms of global genomic expression patterns," *J Bacteriol*, vol. 182, no. 17, pp. 4970-8, 2000.
- 243. Fernández-Cid A, et al., "Glucose levels regulate the nucleo-mitochondrial distribution of Mig2," *Mitochondrion*, vol.12, no. 3, pp. 370-80, 2012.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За темою дисертації опубліковано 9 наукових робіт, серед яких 3 статті у рецензованих журналах, та 6 тез доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких були апробовані результати дисертації.

1. **Dzanaeva L**, Kruk B, Ruchala J, Nielsen J, Sibirny A, Dmytruk K. The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*. (2020). *Cell Biology International*. <u>doi:10.1002/cbin.11353</u>

2. **Dzanaeva L**, Ruchala J, Sibirny A, Dmytruk K. The impact of transcriptional factors Znf1 and Sip4 on xylose alcoholic fermentation in recombinant strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (2020). *Cytology and Genetics*. Vol.54, No.5, pp. 386-392. doi:10.3103/S0095452720050035

3. **Dzanaieva L. S.**, Dmytruk K. V., Sibirny A. A. Transcriptional factor Cat8 is involved in regulation of xylose fermentation in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Фактори експерементальної еволюції організмів. (2018). Т. 22. С. 329-334. <u>https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.970</u>

4. **Dzanaieva L.S**, Kurylenko O.O, Dmytruk K.V, Sibirny A.A Construction of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strains capable of converting xylose into ethanol, 7th International Weigl Conference, September 26-29, Lviv, Ukraine, Book of Abstracts. – 2017.

5. **Dzanaieva L**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strains able to xylose utilization, Conference of young scientists of Institute of Cell biology; Lviv, Ukraine, May 25nd 2017.

6. **Dzanaieva L**, Dmytruk K, Sibirny A. "Effect of deletion of transcription factors on xylose fermentation performants of engineered *Saccharomyces cerevisiae*," Conference of young scientists of Institute of Cell biology, Lviv, Ukraine, May 31nd 2018.

7. **Dzanaieva L**, Dmytruk K, Sibirny A. "Effect of deletion of transcription factors on xylose fermentation performants of engineered *Saccharomyces cerevisiae*," Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. 2018. P 74.

8. **Dzanaieva L**, Dmytruk K, Sibirny A. The role of transcription factors in xylose fermentation of engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae* // 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. June 18-21, 2019, Yaremche, Ukraine.

9. **Dzanaieva L**, Dmytruk K, Sibirny A. The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*, Conference of young scientists of Institute of Cell Biology. – Lviv, Ukraine, May 2019.