

ДМИТРУК К.В.

*Інститут біології клітини НАН України, 79005, Львів, вул. Драгоманова 14/16,
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua*

МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA* ТА *PICHLIA STIPITIS* ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ З ПОКРАЩЕНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ФЕРМЕНТАЦІЄЮ КСИЛОЗИ

Потреби людства в енергії невпинно зростають і якщо в 20 сторіччі викопні джерела цілком забезпечували енергетичні потреби, то у 21 сторіччі ситуація кардинально змінюється. Стрімке вичерпання викопного палива приводить до нестабільності у цінній політиці на енергоносії, особливо на нафту. Спалювання викопних енергоносіїв призводить до погіршення екологічної ситуації внаслідок вивільнення в атмосферу додаткового вуглекислого газу, посилюючи парниковий ефект. Вирішити посталу проблему можна шляхом обмеження спалювання викопних джерел, застосовуючи енергозощаджуючі технології та/або заміною викопних джерел енергії поновлювальними, наприклад рослинною біомасою (лігноцелюлозою). Одним з найбільш розповсюджених типів біопалива отриманих з рослинної біомаси є етанол. На сьогодні етанол отримують з цукру (Бразилія) або крохмалю (США). Вихідна сировина також використовується в їжу людини і в корм тваринам, що обмежує її широке застосування для отримання біоетанолу. До того ж зменшення кількості парникових газів в результаті використання етанолу з цукру чи крохмалю є недостатнім [1]. Встановлено, що етанол із зернових культур суттєво не знижує викиди парникових газів, тоді як використання біомаси замість традиційної сировини для отримання біопалива має суттєві переваги у зниженні викидів парникових газів, адже потребує менше викопного палива для його отримання [2]. Основною причиною збереження енергії та обмеження посилення парникового ефекту при отриманні біопалива з целюлози є наявність побічного продукту переробки біомаси до етанолу — лігніну, що використовується як джерело енергії замість природного газу, що спалюється на більшості спиртзаводах. Іншою підставою для позитивної оцінки отримання етанолу з лігноцелюлози є той факт, що з біомаси можна отримати більше етанолу з одиниці площі. В середньому з одного гектару зернових культур отримують до 4000 літрів спирту. Для підвищення рентабельності, залишкова солома могла би бути перетворена на додаткові 1400 літрів спирту. Використання зернових, що дають більшу біомасу, наприклад просо, також потребують менші затрати викопного палива, підвищуючи сумарний вихід енергії [3]. Лігноцелюлоза доступна у великих кількостях у складі залишків сільського господарства та деревообробної промисловості (солома, тирса, кукурудзяний качан, стебла кукурудзи, лузга соняшникового насіння, кора дерев тощо). Це комплексна сполука з декількох полімерів, що містить окрім глюкози і інші цукри, серед яких п'ятивуглецевий цукор, ксилоза — другий найбільш поширений цукор.

Основною проблемою, на шляху до розробки економічно вигідної технології конверсії цукрів лігноцелюлози до етанолу є відсутність мікроорганізмів, здатних ефективно ферментувати не лише глюкозу, а й ксилозу. Винні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, які традиційно використовуються для отримання етанолу, нездатні ферментувати пентози. Відомо декілька мікроорганізмів здатних до алкогольної ферментації ксилози, зокрема дріжджі *Hansenula polymorpha* та *Pichia stipitis*. Проте вихід етанолу під час мікробної ферментації ксилози є недостатньо високий, що робить цей процес економічно не вигідним. Використання методів метаболічної інженерії дозволяє покращити параметри алкогольної ферментації.

Метаболічна інженерія це сукупність методів та технологій для створення та вдосконалення організмів із заданими характеристиками. Основний принцип метаболічної інженерії полягає у максимально ефективному перетворенні одних сполук в інші. Ефективність перетворення досягається посиленням ланок бажаного шляху метаболізму та обмеженням відтоку метаболітів у суміжні біохімічні шляхи. Такі маніпуляції здійснюються за допомогою методів генної інженерії, посилюючи експресію одних генів та знижуючи або зупиняючи експресію інших, або шляхом введення чужорідних генів. У дріжджів посилення експресії цільового гену досягається шляхом заміни власного промотора на сильний конститутивний або регульований. Тоді як обмеження експресії досягається пошкодженням (делецією) відповідного гена.

Дріжджі *Hansenula polymorpha*

Метилотрофні термотолерантні дріжджі *Hansenula polymorpha* — унікальний організм, здатний до алкогольної ферментації ксилози та глюкози при високій температурі (45–50 °C). Здатність до ферментації лігноцелюлозних цукрів при високій температурі перетворює *H. polymorpha* у перспективний організм для розробки ефективного процесу одночасної сахарифікації та ферментації, при якому ензиматичний гідроліз лігноцелюлози целюлазами та геміцелюлазами, температурний оптимум яких біля 55 °C, відбувається одночасно з ферментацією вивільнених моносахаридів до етанолу. Це обмежує ретроінгібування ензиматичного гідролізу кінцевими продуктами [4].

Метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* є одним з найдокладніше вивчених видів неконвенційних дріжджів. Дріжджі *H. polymorpha* є привабливим об'єктом як з наукової так і з практичної точки зору. Ці дріжджі є об'єктом дослідження механізмів термотолерантності, гомеостазу пероксисом, продукції гетерологічних білків та високотемпературної алкогольної ферментації [5]. Промислове використання *H. polymorpha* обумовлене декількома цікавими особливостями цього виду дріжджів. Дріжджі *H. polymorpha* здатні нагромаджувати значну біомасу у ферментерах, що забезпечує високі виходи цільових продуктів. Як і *S. cerevisiae*, дріжджі *H. polymorpha* ростуть на дешевих та простих поживних середовищах, для них розроблені генетичні методи, є досвід у промисловому використанні та масштабуванні. *H. poly-*

morpha розглядаються як генетично безпечні організми, що не містять патогенів або вірусних інфекцій. До того ж завершено визначення нуклеотидної послідовності геному цих дріжджів, що перетворює *H. polymorpha* у зручний організм для метаболічної інженерії, модифікації та покращення певних біохімічних шляхів. Як зазначалось вище, дріжджі *H. polymorpha* здатні до високотемпературної алкогольної ферментації глюкози, ксилози та целобіози, основних цукрів лігноцелюлозних гідролізатів [6]. Однак ефективність алкогольної ферментації ксилози штамами дикого типу є недостатньо високою. Для покращення виходу етанолу з ксилози, ген бактерійної ксилозоізомерази разом з гомологічним геном ксилулокінази були успішно експресовані в *H. polymorpha* [7; 8]. Експресія модифікованої форми ксилозоредуктази разом з експресією ксилітолдегідрогенази, ксилулокінази та піруватдекарбоксілази призводила до покращення параметрів алкогольної ферментації ксилози при високій температурі (45–48 °C) [9; 10]. Термотолерантність цих дріжджів може бути надалі покращеною шляхом делеції гену, що кодує кислу трегалазу або шляхом посилення експресії генів теплового шоку [11]. Гетерологічні гени, що кодують амілолітичні (α -амілаза та глюкоамілаза) та ксиланолітичні (ендоксилаза та β -ксилозидаза) ферменти були успішно експресовані в *H. polymorpha*, що забезпечило отримання рекомбінантних штамів здатних до високотемпературної алкогольної ферментації крохмалю та ксилану [12]. Покращення параметрів алкогольної ферментації було також досягнуте шляхом застосування методу позитивної селекції із додаванням у середовище токсичних аналогів глюкози та пірувату — 2-дезоксиглюкози та 3-бромпірувату, відповідно. Мутанти, на середовищі з ксилозою з додаванням токсичних концентрацій 2-дезоксиглюкози, можуть виникати внаслідок різних причин, в тому числі внаслідок активації ферментів метаболізму цієї пентози. Тоді як 3-бромпіруват специфічно інгібує ключові ферменти гліколізу-гексокіназу, піруваткіназу та піруватдекарбоксілазу. Такий підхід було застосовано для селекції дріжджових мутантів з підвищеною ефективністю утворення етанолу. Встановлено, що спонтанні мутанти, резистентні до токсичних концентрацій 2-дезоксиглюкози та 3-бромпірувату характеризуються підвищеним рівнем алкогольної ферментації ксилози в півтора-два рази.

В загальному, синтез етанолу з ксилози було підвищено в 10–15 разів. Однак сконструйовані штами у синтезі та продуктивності етанолу з ксилози поступаються дріжджам *P. stipitis* та найкращим з рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*. Максимальна кількість етанолу при ферментації ксилози сконструйованими штамами сягала 10 г/л при 45–48 °C, тоді як для рентабельного застосування технології одночасної сахарифікації та ферментації необхідно досягнути концентрації етанолу 30 г/л.

Дріжджі *Pichia stipitis*

Дріжджі *P. stipitis* є найкращими ферментатором ксилози з усіх відомих мікроорганізмів. Дріжджі *P. stipitis* володіють широким спектром целюлолітичних ферментів. Такі особливості цього організму обумовлені його

природною екологічною нішою. Ці дріжджі були виявлені в кишківнику жуків-пасалідів, що використовують у їжу деревину *P. stipitis* розглядається як надзвичайно перспективний організм для ферментації гідролізатів залишків сільського господарства та деревообробної промисловості. Нещодавно було визначено послідовність нуклеотидів геному дріжджів *P. stipitis* та проведена його анотація [13]. Разом з тим з'явилась стаття, де описано загальний рівень експресії генів залучених у катаболізмі гексоз і пентоз [14]. Встановлено, що рівень експресії генів, що кодують перші два ферменти катаболізму ксилози — ксилоредуктаза та ксилітолдегідрогеназа суттєво підвищуються. Беручи до уваги дисбаланс нуклеотидних кофакторів було посилено експресію модифікованої форми ксилоредуктази із зниженою спорідненістю до NADPH, а також ксилітолдегідрогенази. Відповідні гени було поєднано із сильним конститутивним промотором гліколітичного гену, що кодує гліцеральдегідфосфатдегідрогеназу та введено в реципієнтний штам. В результаті було отримано суттєве покращення алкогольної ферментації ксилози, на 39% при посиленні експресії модифікованої форми ксилоредуктази та на 40% при посиленні експресії ксилітолдегідрогенази.

Окрім того проводилось посилення експресії генів, що кодують пірватдекарбоксілазу та алкогольдегідрогеназу. Ці ферменти беруть участь в останніх реакціях синтезу етанолу. А також гени неокислювальної ланки пентозофосфатного шляху — трансальдолазу та транскетолазу, за участі яких метаболізм ксилози сполучається з гліколізом. Одночасне посилення експресії усіх чотирьох генів стимулювало алкогольну ферментацію ксилози на 34%.

Майбутні перспективи

Незважаючи на значні успіхи у конструюванні рекомбінантних мікроорганізмів — продуцентів паливного етанолу, отримати промисловий продуцент етанолу другого покоління поки що не вдається. Ведеться активна пошукова робота у напрямках покращення ефективності транспорту ферментуючого субстрату у клітину, гліколізу, блокування реутилізації утвореного етанолу, зниження чутливості мікроорганізмів до синтезованого етанолу та інших інгібіторів ферментації, обмеження зростання біомаси, регуляція синтезу етанолу, розробка ефективних методів селекції продуцентів етанолу тощо. Враховуючи першочерговість та гостроту світових проблем енергозабезпечення та екологічного балансу, ефективні продуценти етанолу з повноланою сировини будуть створені в близькому майбутньому.

Література

1. Farrell A., Plevin R., Turner B., Jones A.D., O'Hare M., Kammen D. Ethanol can contribute to energy and environmental goals // Science.— 2006.— Vol.311.— P. 506–508.
2. Hill J., Polasky S., Nelson E., Tilman D., Huo H., Ludwig L., Neumann J., Zheng H., Bonta D. Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2009.— Vol.106.— P. 2077–2082.

3. Schubert C. Can biofuels finally take center stage? // Nat. Biotechnol.— 2006.— Vol.24.— P. 777–784.
4. Olofsson K., Bertilsson M., Lidén G. A short review on SSF — an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks // Biotechnol. Biofuels.— 2008.— Vol.1(1): 7.
5. Gellissen G. (Ed.) (2002) *Hansenula polymorpha* — Biology and Applications. Wiley-VCH, Weinheim.
6. Ryabova O., Chmil O., Sibirny A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res.— 2003.— Vol.4.— P. 157–164.
7. Voronovsky A., Ryabova O., Verba O., Ishchuk O., Dmytruk K., Sibirny A. Expression of *xylA* genes encoding xylose isomerases from *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res.— 2005.— Vol.5.— P. 1055–1062.
8. Dmytruk O., Voronovsky A., Abbas C., Dmytruk K., Ishchuk O., Sibirny A. Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res.— 2008.— Vol.8.— P. 165–173.
9. Dmytruk O., Dmytruk K., Abbas C., Voronovsky A., Sibirny A. Engineering of xylose reductase and overexpression of xylitol dehydrogenase and xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* // Microbial Cell Factories.— 2008.— 7: 21.
10. Ishchuk O., Voronovsky A., Stasyk O., Gayda G., Gonchar M., Abbas C., Sibirny A. Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature fermentation of xylose // FEMS Yeast Res.— 2008.— Vol.8.— P. 1164–1174.
11. Ishchuk O., Voronovsky A., Abbas C., Sibirny A. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance // Biotechnol. Bioeng.— 2009.— Vol.104.— P. 911–919.
12. Voronovsky A., Rohulya O., Abbas C., Sibirny A. Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan // Metab. Eng.— 2009.— Vol.11.— P. 234–242.
13. Jeffries T., Grigoriev I., Grimwood J., Laplaza J., Aerts A., Salamov A., Schmutz J., Lindquist E., Dehal P., Shapiro H., Jin Y., Passoth V., Richardson P. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* // Nat. Biotechnol.— 2007.— Vol.25.— P. 319–326.
14. Jeffries T., Van Vleet J. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters // FEMS Yeast Res.— 2009.— Vol.9.— P. 793–807.

Резюме

За допомогою методів метаболічної інженерії було сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *H. polymorpha* та *P. stipitis* з покращеною алкогольною ферментацією ксилози.

С помощью методов метаболической инженерии сконструированы рекомбинантные штаммы дрожжей *H. polymorpha* и *P. stipitis* с улучшенными параметрами алкогольной ферментации ксилозы.

Recombinant yeast strains of *H. polymorpha* and *P. stipitis* with increased alcoholic fermentation of xylose were constructed using metabolic engineering approaches.

**ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р.,
ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.**

Учреждение РАН Институт биологии УНЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, ул. Проспект Октября, 61, e-mail: tvmark@anrb.ru

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ *GLUCONOBACTER OXYDANS* 2Т В ОБЛАСТИ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ОТ ГЕРБИЦИДА 2,4,5-Т

2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т) — синтетическое соединение, используемое в качестве гербицида для борьбы с древесной и кустарниковой растительностью, обработки газонов, лесных угодий, пастбищ. Вместе с тем в ряде работ было показано, что 2,4,5-Т способна оказывать значительный мутагенный и канцерогенный эффект на живые системы [1]. Отмечено, что 2,4,5-Т является недоступным или малодоступным источником углерода и энергии для большинства микроорганизмов, что ведет к накоплению и постепенному распространению этого ксенобиотика по пищевым цепям [2]. Анализ работ, касающихся поиска и исследования особенностей деструкторов, показал, что интерес к микроорганизмам-деструкторам 2,4,5-Т связан с возможностью использовать их на практике при создании биологических технологий очистки почвы от экологически опасных соединений.

Объектом исследований служил бактериальный штамм, выделенный из образца почвенных популяций микроорганизмов.

В эксперименте использовали минимальную солевую среду следующего состава в г/л: NH_4Cl — 1; K_2HPO_4 — 5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; ZnSO_4 — 0,008; pH — 6,8–7,0. В качестве единственного источника углерода и энергии добавляли 2,4,5-Т до конечной концентрации 100 мг/л.

Определение количества 2,4,5-Т в культуральной жидкости проводили согласно методам определения микроколичеств 2,4,5-Т с небольшими модификациями [3].

Для идентификации продуктов катаболизма 2,4,5-Т метилированные экстракты метаболитов подвергали анализу на хроматомасс-спектрометрической системе хроматограф HP 5890 с масс-селективным детектором HP 5972A.

В опытах с почвой посевной материал культуры вносили из расчета 10^5 – 10^6 КОЕ на 1 г почвы, содержащей 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/кг. Обработку проводили в течение 48 суток в лабораторных условиях при естественном суточном колебании температур летнего периода.

Исследуемый штамм был идентифицирован согласно культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам как *Gluconobacter oxydans* [4]. Клетки штамма представляют собой подвижные коккоба-