

**К.В. Дмитрук¹, О.О. Куриленко¹, О.П. Іщук¹, В.М. Убийвовк¹,
В.А. Сибірний², Д.В. Федорович¹, А.А. Сибірний^{1,2}**

¹ Інститут біології клітини НАН України, Львів

² Жешувський університет, Жешув, Польща

КОНСТРУЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ШТАМУ ДРІЖДЖІВ *PICHIA STIPITIS* З ПОЛІПШЕНИМИ ПАРАМЕТРАМИ АЛКОГОЛЬНОЇ ФЕРМЕНТАЦІЇ КСИЛОЗИ



За допомогою сайт-специфічного мутагенезу створено модифіковану форму ксилоредуктази дріжджів *Pichia stipitis* зі зниженою спорідненістю до NADPH(H⁺). Одержано рекомбінантний штам *P. stipitis* з посиленою експресією модифікованої форми ксилоредуктази, який характеризувався підвищеною в 1,3 раза продуктивністю алкогольної ферментації ксилози. Продуктивність алкогольної ферментації гідролізатів висівок та тирси сконструйованим штамом були також підвищені.

Ключові слова: етанол, дріжджі, *Pichia stipitis*, ксилоза, алкогольна ферментація.

Швидке вичерпування запасів викопних енергоносіїв (нафта, природний газ) та пов'язане з їх використанням забруднення оточуючого середовища підвищують інтерес до поновлювальних джерел енергії, зокрема біопаливного етанолу. Викопні енергоносії витрачаються в основному у вигляді рідкого пального у транспортному секторі. Етанол придатний до використання у звичайних двигунах внутрішнього згоряння як бензино-етанольна суміш або у чистому вигляді у спеціалізованих двигунах. Суміші мають підвищене октанове число та підвищену леткість. На сьогодні етанол отримують з цукру або крохмалю за допомогою спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Однак існуючі кількості вихідної сировини не забезпечують зростаючих потреб у біоетанолі, адже крохмаль та цукор є важливими харчовими продуктами та харчовими субстра-

тами. Найбільш оптимальним та перспективним шляхом є отримання біопаливного етанолу з поновлювальної та дешевої сировини, особливо з гідролізатів лігноцелюлозних відходів сільського господарства та деревообробної промисловості. Серед основних цукрів лігноцелюлозних гідролізатів, окрім гексоз, значний відсоток (35–45 %) складають пентози (ксилоза, арабіноза). Однак сахароміцети нездатні до алкогольної ферментації та й взагалі метаболізму пентоз [1]. Значна кількість робіт присвячена спробам сконструювати штами винних дріжджів, здатних до алкогольної ферментації ксилози, однак значних успіхів у цьому напрямку поки що не досягнуто [2]. Варто зазначити, що ферментувати пентози здатна досить обмежена група мікробів, серед яких найбільший інтерес викликають дріжджі *Pichia stipitis*. Однак ефективність ферментації цієї пентози природними штамами недостатня для забезпечення економічно вигідного промислового процесу,

© К.В. ДМИТРУК, О.О. КУРИЛЕНКО, О.П. ІЩУК,
В.М. УБИЙВОВК, В.А. СИБІРНИЙ,
Д.В. ФЕДОРОВИЧ, А.А. СИБІРНИЙ, 2010

хоча рівень алкогольної ферментації ксилози *P. stipitis* наближається до теоретично можливого максимуму [3].

Наші зусилля були спрямовані на покращення ефективності алкогольної ферментації природними штамами цього виду дріжджів за допомогою сучасних методів метаболічної інженерії. У даній роботі представлено конструювання рекомбінантного штаму *P. stipitis* з посиленою експресією модифікованої форми ксилоредуктази (першого ферменту катаболізму ксилози), який характеризується підвищеною продуктивністю алкогольної ферментації ксилози.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Штами мікроорганізмів та поживні середовища

У роботі використовували штаму *P. stipitis* PLU20 (*ura3 leu2*) [4], *S. cerevisiae* BY4742 (*his3Δ leu2Δ lysΔ ura3Δ*) (Euroscarf, Frankfurt). Дріжджі вирощували на багатому YPD (0,5 % дріжджового екстракту, 1 % пептону, 2 % глюкози) або на мінімальному YNB (0,67 % YNB (*Yeast, Nitrogen Base*), 2 % ксилози або 2 % глюкози) середовищах при 28–30 °C упродовж 2–6 діб. Для культивування ауксотрофних мутантів до мінімального середовища додавали лейцин, урацил, гістидин та лізин в концентрації 40 мг/л середовища. Пшеничні висівки гідролізували за допомогою закваски Леснова – суміш целюлозолітичних, пектолітичних, амілолітичних мікроорганізмів (патент на винахід РФ № 2122330; препарат є в продажі). Для приготування робочої закваски використовували таке співвідношення компонентів: закваска Леснова (мг): висівки (г) : вода (мл) = 1 : 1 : 2. Робочу закваску витримували 3–4 год при температурі 28–30 °C. Робочу закваску змішували з сухими висівками та водою у такому співвідношенні: робоча закваска (г) : сухі висівки (г) : вода (мл) = 1 : 100 : 100. Отриману суміш інкубували 12 год при температурі 55–60 °C, додавали 2 об'єми води, перемішували та відділяли рідку фазу за допомогою центрифугування.

Гідролізували тирсу розведеною сірчаною кислотою. До 1 г тирси додавали 40 мл 10 % H_2SO_4 , суміш послідовно автоклали 2 рази при 1,1 атм упродовж 30 хв. Після охолодження нейтралізували 10 н розчином КОН до pH 5–6. Оскільки під час гідролізу вивільняється незначний відсоток цукрів (менше 1 г/л), ферментацію проводили на гідролізатах тирси з додаванням зернового сусла.

Бактерійний штам *Escherichia coli* DH5α (Φ80 *dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17* (r_K^-, m_K^+), *supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)* U169) вирощували при 37 °C на багатому середовищі LB (0,5 % дріжджовий екстракт, 1 % пептон, 1 % NaCl). Для селекції плазмидовмісних бактерій використовували ампіцилін (кінцева концентрація 100 мг/л).

Методи досліджень

У роботі використано стандартні молекулярно-генетичні методи [5]. Геномну ДНК *P. stipitis* ізолювали за допомогою Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції і лігаза використовувалися згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Виділення плазмідної ДНК з *E. coli* проводилося за допомогою Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) з використанням Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) згідно з інструкцією виробника. При ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР використовували синтетичні олігонуклеотидні праймери фірми «IDT Technologies» (США). Трансформацію *P. stipitis* проводили хімічним методом [6].

Біомасу дріжджів визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Helios γ ($\lambda = 590$ нм, кювета 1 см), розраховуючи суху вагу за калібрувальною кривою.

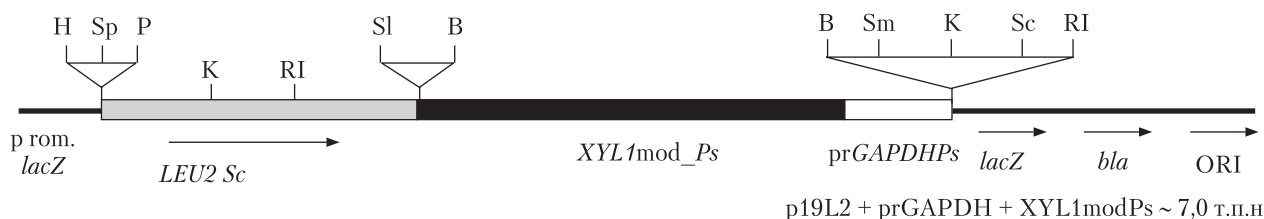
Для визначення продуктивності алкогольної ферментації ксилози клітини дріжджів нарощували в багатому середовищі YPX (1 % дріжджового екстракту, 2 % пептону, 4 % ксилози) протягом двох діб. Біомасу (1 мг/мл клітин) переносили на мінімальне середовище, що містило 9 % ксилози, гідролізати висівок або гідролізати тирси з зерновим суслом (3,5 °Б). Ферментація проводилася при температурі 30 °С за умов обмеженої аерації (105 об./хв). Концентрації етанолу, ксилози, глюкози та арабінози в середовищі визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (PerkinElmer, Series 2000, USA), використовуючи іонообмінну колонку Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA). Як рухому фазу використовували 4 мМ H₂SO₄ при швидкості потоку 0,6 мл/хв при температурі колонки 35 °С. Концентрацію етанолу в середовищі також визначали за допомогою набору «Алкотест» [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Бродіння ксилози у дріжджовій клітині починається з її відновлення до ксиліту за допомогою NADPH(H⁺)-залежної ксилоредуктази (КР), який далі за допомогою NAD⁺-залежної ксилітолдегідрогенази (КДГ) окислюється до ксилулози. В результаті цих окисно-відновних реакцій при обмеженій аерації під час ферментації відбувається накопичення NADP⁺ та NADH(H⁺), що призводить до акумуляції побічних продуктів та зниження кількості синтезованого етанолу. КР дріжджів *P. stipitis* використовує як кофактор не тільки NADPH(H⁺), але й NADH(H⁺), однак її спорідненість до NADH(H⁺) низька [8]. Встановлено, що рівень експресії гена *XYL1*, що кодує КР, під час алкогольної ферментації ксилози дріжджами *P. stipitis* суттєво підвищується [9]. З урахуванням дисбалансу нуклеотидних кофакторів було запропоновано знизити спорідненість КР до NADPH(H⁺) та посилити експресію такої модифікованої форми КР в геномі дріжджів *P. stipitis*.

КР ксилозоутилізуючих дріжджів, зокрема домен, що відповідає за зв'язування кофактора, мають високий ступінь гомології. За допомогою сайт-специфічного мутагенезу було здійснено зміну кофакторної спорідненості КР *P. stipitis* за аналогією до успішної модифікації КР *Candida tenuis* [10] та *Hansenula polymorpha* [11], яка призвела до зниження спорідненості КР до NADPH(H⁺). Здійснено заміну амінокислотних залишків лізину та аспарагіну на аргінін і аспарагінову кислоту в положеннях 271 і 273 відповідно. Модифікацію було проведено за допомогою ПЛР з використанням праймерів, в які попередньо були внесені відповідні нуклеотидні заміни. Пари праймерів IS314 (ATG CCT TCT ATT AAG TTG AAC TCT GGT TAC GAC ATG CC) / IS311 (CAA CAA TCT TGG GAC AGT GTC GGA CCT TGG AAT GAT GGC AAT GC) та IS312 (GCA TTG CCA TCA TTC CAA GGT CCG ACA CTG TCC CAA GAT TGT TG) / IS313 (TAC GGA TCC TCT CAT TTG ATT CCT TGG CAG ACA TG) було використано для ампліфікації N- та C-фрагментів гена *XYL1 P. stipitis*. Відповідні фрагменти, а також сильний конститутивний промотор гена *GAPDH P. stipitis* (кодує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу), ампліфікований праймерами IS62 (TAT GGA TCC GCA ACT GGA TGA GGT GCT ATC) / IS310 (CAA CTT AAT AGA AGG CAT GAT GAA TTG TTT ATA GGG AAG) були об'єднані за допомогою пари праймерів IS62/IS313. Отриманий фрагмент, що містить відкриту рамку зчитування модифікованого гена *XYL1 P. stipitis* під контролем сильного конститутивного промотора *GAPDH*, було оброблено рестриктазою *Bam*HI і клоновано у *Bam*HI-лінеаризований та дефосфорильований вектор p19L2 [12]. Сконструйована плазмідна отримала назву p19 L2+pr *GAPDH* + *XYL1modPs* (див. рисунок).

Коректність внесеної заміни було підтверджено шляхом визначення послідовності нуклеотидів відповідного гена *XYL1* із використанням праймерів IS314 і IS313 на фірмі «Eurofins MWG Operon» (Німеччина).



Лінійна схема плазмиди p19L2+prGAPDH+XYL1modPs. Фрагмент, що містить модифікований ген *XYL1 P. stipitis*, позначено чорною смугою; фрагмент, що містить промотор *GAPDH P. stipitis*, позначено білою смугою; фрагмент, що містить ген *LEU2 S. cerevisiae*, позначено сірою смугою; тонкою чорною лінією позначено бактерійну частину вектора. Сайти рестрикції позначено: H, *HindIII*; Sp, *SphI*; K, *KpnI*; RI, *EcoRI*; Sl, *SalI*; B, *BamHI*; Sm, *SmaI*; Sc, *SacI*.

SacI-лінеаризований вектор p19L2+prGAPDH+XYL1modPs трансформували у штам PLU20 (*leu2, ura3*) *P. stipitis*. Селекцію *Leu*⁺ трансформантів проводили на мінімальному середовищі YNB з урацилом. Стабільність *Leu*⁺ інтегрантів перевіряли шляхом почергового культивування в неселективному та селективному середовищах. Наявність у геномі сконструйованих штамів рекомбінантної конструкції *prGAPDH-XYL1 P. stipitis* перевіряли за допомогою ПЛР з використанням відповідної пари праймерів IS62 / IS313. Було визначено ефективність алкогольної ферментації ксилози відібраним стабільним трансформантом XYL1m9. Продуктивність алкогольної ферментації ксилози у сконструйованого штаму становила

0,34 г/(л·год), що перевищує продуктивність вихідного штаму в 1,3 раза (табл.). Максимальна концентрація синтезованого етанолу становила 33 г/л на четверту добу ферментації.

Проводилося визначення ефективності алкогольної ферментації гідролізатів пшеничних висівок. Продуктивність синтезу етанолу рекомбінантним штамом XYL1m9 становила 0,15 г/(л·год), що перевищує продуктивність синтезу етанолу вихідного штаму на 15 % (табл.). Максимальна концентрація синтезованого етанолу становила 10,8 г/л на другу добу ферментації. Загальний вміст гексоз та пентоз у гідролізатах пшеничних висівок в наших експериментах становив близько 35 г/л. Гідролізати пшеничних висівок містили близько 60 % глюкози, 37 % ксилози та 3 % арабінози. Відомо, що найкращими ферментаторами глюкози є сахароміцети. Однак сахароміцети нездатні ферментувати ксилозу, тому було запропоновано провести коферментацію, використовуючи два мікроорганізми: рекомбінантний штам *P. stipitis* XYL1m9 та штам дикого типу *S. cerevisiae* BY4742 у співвідношенні клітин 1 : 1. Продуктивність алкогольної коферментації гідролізатів пшеничних висівок була вищою, ніж з використанням окремих штамів *P. stipitis* та *S. cerevisiae* і становила 0,25 г/(л·год) проти 0,16 г/(л·год) та 0,11 г/(л·год), відповідно (див. табл.), що в 1,6 раза перевищувало продуктивність ферментації рекомбінантного штаму XYL1m9. Максимальна концентрація синтезованого етанолу становила 18 г/л.

Продуктивність синтезу етанолу штамми *P. stipitis* та *S. cerevisiae* на різних середовищах

Штам	Продуктивність синтезу етанолу г/(л·год)		
	YNB + 9 % ксилоза	Гідролізати пшеничних висівок	Гідролізати тирси + сусло 3,5 °Б
<i>P. stipitis</i> PLU20 (дикий тип)	0,26 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,08 ± 0,01
<i>P. stipitis</i> XYL1m9 (рекомбінантний штам)	0,34 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02
<i>S. cerevisiae</i> BY4742 (дикий тип)	—	0,11 ± 0,02	—
<i>P. stipitis</i> XYL 1m9 + <i>S. cerevisiae</i> BY4742	—	0,25 ± 0,03	—

Знак (—) — не визначали

Також проводили алкогольну ферментацію промислового середовища на основі гідролізатів тирси. Продуктивність синтезу етанолу рекомбінантним штамом XYL1m9 становила 0,15 г/(л · год), що перевищує продуктивність синтезу етанолу вихідним штамом в 1,9 раза (див. табл.). Максимальна концентрація синтезованого етанолу становила 10,5 г/л на третю добу ферментації.

Результати наведених досліджень дозволили розробити лабораторний і напівпромисловий регламенти отримання етанолу з гідролізатів рослинної біомаси, що дає можливість масштабувати процес і розпочати налагодження виробництва етанолу з вищезгаданої сировини.

ВИСНОВКИ

За допомогою методів генної інженерії сконструйовано рекомбінантний штам дріжджів *P. stipitis* з підвищеною в 1,3 раза продуктивністю алкогольної ферментації ксилози. Введення в геном дріжджів *P. stipitis* гену *XYL1mod*, що кодує модифіковану форму КР зі зниженою спорідненістю до NADPH(H⁺) під контролем сильного конститутивного промотора гена *GAPDH*, забезпечило нагромадження підвищених кількостей етанолу при ферментації ксилози.

Параметри алкогольної ферментації гідролізатів лігноцелюлози (висівки та тирса) сконструйованим штамом були також поліпшені в 1,5 раза порівняно зі штамом дикого типу дріжджів *S. cerevisiae*. Синтез етанолу додатково може бути підвищений у 1,6 раза шляхом одночасного використання суміші двох штамів дріжджів — рекомбінантного штаму XYL1m9 *P. stipitis* та штаму дикого типу *S. cerevisiae*. Розроблені лабораторний і напівпромисловий регламенти отримання етанолу з гідролізатів рослинної біомаси дають можливість масштабувати процес і розпочати налагодження виробництва етанолу з вищезгаданої нехарчової сировини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Jeffries T.W., Jin Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — Vol. 63. — P. 495–509.
2. Van Maris A.J., Abbott D.A., Bellissimi E., et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status // Antonie Van Leeuwenhoek. — 2006. — Vol. 90, № 4. — P. 391–418.
3. Jeffries T.W., Grigoriev I.V., Grimwood J., et al. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* // Nat. Biotechnol. — 2007. — Vol. 25, № 3. — P. 319–326.
4. Lu P., Davis B.P., Hendrick J., Jeffries T.W. Cloning and disruption of the beta-isopropylmalate dehydrogenase gene (*LEU2*) of *Pichia stipitis* with *URA3* and recovery of the double auxotroph // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1998. — Vol. 49, № 2. — P. 141–146.
5. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
6. Passoth V., Hahn-Hagerdal B. Production of a heterologous endo-1,4-beta-xylanase in the yeast *Pichia stipitis* with an O₂-regulated promoter // Enzyme and Microbial Technologies. — 2000. — Vol. 26. — P. 781–784.
7. Gonchar M.V., Maidan M.M., Sibirny A.A. A new oxidase-peroxidase kit «Alcotest» for ethanol assays in alcoholic beverages // Food Technol. Biotechnol. — 2001. — Vol. 39. — P. 37–42.
8. Verduyn C., van Kleef R., Frank J., et al. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* // Biochem. J. — 1985. — Vol. 226. — P. 669–677.
9. Jeffries T., van Vleet J. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters // FEMS Yeast Res. — 2009. — Vol. 9. — P. 793–807.
10. Petschacher B., Nidetzky B. Engineering *Candida tenuis* xylose reductase for improved utilization of NADH: antagonistic effects of multiple side chain replacements and performance of site-directed mutants under simulated in vivo conditions // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — Vol. 71, № 10. — P. 6390–6393.
11. Dmytruk O.V., Dmytruk K.V., Abbas C.A., et al. Engineering of xylose reductase and overexpression of xylitol dehydrogenase and xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* // Microb. Cell. Fact. — 2008. — Vol. 23. — P. 7–21.
12. Voronovsky A.A., Abbas C.A., Fayura L.R., et al. Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata* // FEMS Yeast Res. — 2002. — Vol. 2, № 3. — P. 381–388.

К.В. Дмитрук, О.О. Куриленко,
О.П. Ищук, В.М. Убийвовк, В.А. Сибирный,
Д.В. Федорович, А.А. Сибирный

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО
ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *PICHLA STIPITIS*
С УЛУЧШЕННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ
ФЕРМЕНТАЦИЕЙ КСИЛОЗЫ

С помощью сайт-специфического мутагенеза создана модифицированная форма ксилоредуктазы дрожжей *Pichia stipitis* со сниженным сродством к NADPH(H⁺). Сконструирован рекомбинантный штамм *P. stipitis* с усиленной экспрессией модифицированной формы ксилоредуктазы, характеризующийся повышенной в 1,3 раза продуктивностью алкогольной ферментации ксилозы. Продуктивность алкогольной ферментации гидролизатов отрубей и опилок сконструированным штаммом были также улучшены.

Ключевые слова: этанол, дрожжи, *Pichia stipitis*, ксилоза, алкогольная ферментация.

K.V. Dmytruk, O.O. Kurylenko,
O.P. Ishchuk, V.M. Ubiyovok, V.A. Sibirny,
D.V. Fedorovych, A.A. Sibirny

CONSTRUCTION OF THE RECOMBINANT YEAST
STRAIN OF *PICHLA STIPITIS* WITH IMPROVED
ALCOHOLIC FERMENTATION OF XYLOSE

The modified form of the xylose reductase (XR) of *Pichia stipitis* with decreased affinity toward NADPH(H⁺) was created via site-specific mutagenesis. Recombinant strain of *P. stipitis* overexpressing the mutated XR characterized by 1,3-fold increase in productivity of xylose alcoholic fermentation was constructed. The rates of alcoholic fermentation of hydrolyzates of wheat bran and sawdust were also improved.

Key words: ethanol, yeast, *Pichia stipitis*, xylose, alcoholic fermentation.

Надійшла до редакції 07.04.10