

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЭТАНОЛА

До недавнего времени никто не рассматривал метилотрофные дрожжи как потенциальный продуцент биотоплива, в частности биоэтанола, из гидролизатов лигноцеллюлозы. Десять лет назад опубликована первая работа, раскрывающая способность термотолерантных метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* сбраживать один из основных сахаров лигноцеллюлозы — ксилозу, что сделало эти дрожжи перспективным организмом для проведения высокотемпературной алкогольной ферментации [1]. Такая особенность дрожжей *H. polymorpha* может быть использована при реализации потенциально эффективного процесса одновременного осахаривания и ферментации (ООФ) сырья. ООФ позволяет соединить ферментативный гидролиз сырья с конверсией образующихся сахаров в этанол: ферменты гидролизуют полисахариды до мономерных сахаров, которые немедленно потребляются микроорганизмами — продуцентами этанола. Однако эффективность алкогольной ферментации дикими штаммами *H. polymorpha* основных сахаров — продуктов гидролиза лигноцеллюлозного сырья, и особенно ксилозы, требует значительного улучшения. В настоящем обзоре изложены основные результаты в области метаболической инженерии *H. polymorpha* для конструирования продуцентов этанола из ксилозы, крахмала, ксилана и глицерина, а также штаммов с повышенной толерантностью к высокой температуре и этанолу.

**Ключевые слова:** дрожжи, этанол, *H. polymorpha*, метаболическая инженерия.

**Введение.** В настоящее время наша цивилизация столкнулась с возрастающими потребностями в энергии для транспортного сектора, а также для обеспечения отопления и промышленных процессов. Интенсификация использования ископаемого топлива приводит к увеличению выбросов парниковых газов в атмосферу, оказывая негативное воздействие на окружающую среду. Нестабильность обеспечением нефтью и постоянные колебания цен на этот энергоноситель стимулируют ин-

терес к альтернативным источникам энергии. Перечисленные экономические и экологические факторы определяют заинтересованность в использовании возобновляемых источников энергии [2].

Этанол является перспективным возобновляемым жидким топливом, который в течение ближайших 20 лет обещает стать одним из основных видов биотоплива в транспортном секторе [3]. Этанол в смеси с бензином эффективно используется в обычных двигателях внутреннего сгорания. В чистом виде спирт также находит свое применение в специализированных двигателях. У этанола в отличие от бензина выше октановое число, а также повышенная теплота парообразования, что превращает спирт в отличное топливо для гибридных автомобилей следующего поколения.

На сегодняшний день для получения биотоплива в промышленных масштабах в качестве сырья используют кукурузу или сахарный тростник. Этанол, полученный из крахмала или сахара, так называемый этанол первого поколения, конкурирует за сырье с пищевой промышленностью и сельским хозяйством. В противоположность этому растительная биомасса (лигноцеллюлоза), в частности отходы сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, а также бытовые отходы, обладает существенным потенциалом для получения биотоплива. Это сырье распространено во всем мире и является побочным продуктом человеческой деятельности. Кроме того, такие отходы не имеют альтернативного использования. Существуют также и другие преимущества этанола второго поколения, полученного из лигноцеллюлозы. Среди них уменьшение выбросов парниковых газов в атмосферу, снижение негативного воздействия на окружающую среду, особенно на изменение климатических условий (глобальное потепле-

ние), возможность повышения трудовой занятости населения в аграрных районах, а также улучшенный энергетический баланс в сравнении с традиционными для ферментации субстратами [4].

Однако процесс конверсии лигноцеллюлозной биомассы в этанол является значительно более сложным процессом по сравнению с получением этанола из крахмала или сахара. На первых этапах лигноцеллюлоза требует предварительной термической и/или химической обработки. После этого проводят гидролиз предварительно обработанного сырья серной кислотой или с помощью гидролитических ферментов (оптимум действия ферментов находится в температурном диапазоне 50–60 °С) для получения мономерных сахаров. Этот процесс получил название – «осахаривание». В полученной смеси моносахаридов вторым по содержанию сахаром после глюкозы является ксилоза (пятиуглеродный сахар). Ферментацию мономерных сахаров на пилотных заводах по переработке лигноцеллюлозного сырья (ЮGen, Abengoa и др.) осуществляют с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые ферментируют исключительно гексозы. Однако исследователи направляют свои усилия на конструирование бактериальных (*Escherichia coli*, *Zyotomonas mobilis*) и дрожжевых (*S. cerevisiae*, *Pichia stipitis*) штаммов, способных ферментировать все высвобожденные сахара, особенно ксилозу. Такие штаммы могут быть использованы для ферментации смеси сахаров гидролизатов лигноцеллюлозы, полученных посредством кислотного гидролиза, который является достаточно дешевым методом, однако около 30 % сахаров при гидролизе превращаются в фурфурол и 5-гидроксиметилфурфурол. Накопление этих компонентов негативно влияет на процесс ферментации: 1) снижение выхода этанола на 30 %; 2) существенное ингибирование ферментации. Указанные негативные воздействия не наблюдаются при проведении энзиматического гидролиза, поскольку накопление фурфурола и 5-гидроксиметилфурфурола не происходит. Однако мономерные сахара, являющиеся конечными продуктами гидролиза, ингибируют энзиматические активности гидролитических ферментов целлюлаз и гемицеллюлаз. Для достижения пол-

ного гидролиза гетерополимеров лигноцеллюлозы высвобожденные сахара должны быть конвертированы в этанол при участии микроорганизмов, присутствующих в том же резервуаре [5].

Ферментативный гидролиз (осахаривание) и ферментацию осуществляют одновременно. Такой процесс получил название одновременного осахаривания и ферментации (ООФ) [3], в нем не происходит ингибирование гидролитических ферментов освобождаемыми сахарами, поскольку последние сразу метаболизируются микроорганизмами. Помимо этого, важным является существенное снижение стоимости процесса, что обусловлено отсутствием стадии охлаждения между осахариванием и спиртовым брожением. Дополнительные средства могут быть сэкономлены за счет снижения разницы температур при переходе от стадии брожения к стадии дистилляции [6].

На сегодняшний день эффективность процесса ООФ лигноцеллюлозной биомассы еще детально не изучена. Среди нерешенных проблем на пути преобразования лигноцеллюлозы к этанолу является отсутствие микроорганизмов, способных к эффективной конверсии ксилозы в этанол при повышенных температурах. Одним из наиболее перспективных организмов, способных осуществлять алкогольную ферментацию ксилозы при температуре около 50 °С, являются дрожжи *Hansenula polymorpha* [7]. Однако эффективность этого процесса с использованием штаммов дикого типа слишком низка для внедрения в промышленное производство (0,5 г/л спирта при ферментации ксилозы).

#### Микроорганизмы для получения этанола из лигноцеллюлозной биомассы

Исследованиями в области алкогольной ферментации лигноцеллюлозной биомассы занимаются во многих развитых странах мира. Эти междисциплинарные исследования вовлекают ученых из разных областей – генетиков, биохимиков, химиков, технологов, инженеров, математиков, экономистов. Подсчитано, что получение этанола в промышленных масштабах из растительной биомассы позволит уменьшить импорт нефтепродуктов в США на треть. Этанол, полученный из отходов сельскохозяй-

ственной деятельности, вызывает значительно меньшие выбросы парниковых газов в атмосферу, чем этанол, полученный из зерновых культур. По данным Министерства энергетики США (<http://www.energy.gov/>) этанол из лигноцеллюлозы уменьшает выбросы парниковых газов на 85 % по сравнению с использованием бензина. В то же время производство этанола из крахмала (например кукурузы) сокращает выбросы парниковых газов лишь на 18–29 % меньше бензина, поскольку в данном случае для его производства используют природный газ. Это еще один аргумент в пользу разработки эффективной технологии производства топливного этанола из растительной биомассы.

И в то же время, несмотря на многолетние усилия, рентабельные технологии для осуществления этого процесса до сих пор не разработаны. Создание эффективной технологии конверсии лигноцеллюлозы в этиловый спирт можно условно разделить на два направления. Первое — оптимизация методов физической, физико-химической и энзиматической обработки лигноцеллюлозных отходов с целью получения свободных моно- и дисахаров из очень сложной смеси составляющих лигноцеллюлозу биополимеров (целлюлоза, гемицеллюлозы, лигнин). Второе — поиск природных и конструирование рекомбинантных штаммов микроорганизмов, способных к эффективной ферментации всех сахаров, входящих в состав гидролизатов лигноцеллюлозы. Трудности возникают с алкогольной ферментацией ксилозы, второго по количеству сахара гидролизата лигноцеллюлозы (в среднем, доля этой пентозы составляет 30 % общего содержания сахаров в гидролизатах). Хотя ксилоза широко распространена в природе, она практически никогда не встречается как свободный моносахарид, поэтому лишь достаточно ограниченная группа микроорганизмов способна использовать ксилозу в качестве источника углерода, а еще меньшая — ферментировать этот сахар в этанол.

Ученые США, Канады, Германии, Швеции, Финляндии, Китая, Южной Африки и других стран занимаются созданием и улучшением штаммов, сбрасывающих ксилозу в этанол. Одни исследователи конструируют соответствующие штаммы на основе бактерий (кишечная палочка *E. coli* и *Z. mobilis*), другие в качестве

объекта исследований используют дрожжи. В целом ферментация с использованием дрожжей имеет существенные преимущества, поскольку дрожжевые клетки являются большими и поэтому легче отделяются от ферментационной среды. Дрожжи не чувствительны к фаголизису. Кроме того, эффективная технология получения этилового спирта из глюкозы или сахарозы при участии пекарских дрожжей существует уже на протяжении веков. К сожалению эти дрожжи не способны метаболизировать ксилозу. Во многих лабораториях мира проводится метаболическая инженерия пекарских дрожжей с целью конструирования штаммов, ферментирующих не только глюкозу, но и ксилозу. В качестве альтернативы ведется поиск неконвенционных видов дрожжей, сбрасывающих ксилозу, и путей дальнейшего улучшения параметров алкогольной ферментации конструированием более продуктивных штаммов.

Достигнут значительный прогресс в выявлении и изучении некоторых видов неконвенционных дрожжей, ферментирующих основные сахара лигноцеллюлозных гидролизатов в этанол, в частности, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* [8–10]. Подобраны условия алкогольной ферментации ксилозы штаммами этих неконвенционных дрожжей [11]. Установлена определяющая роль начальных этапов катаболизма ксилозы для эффективной ферментации этого сахара в этанол. В частности, установлено первостепенное значение эффективной экспрессии генов *XYL1*, *XYL2* и *XYL3*, кодирующих ферменты трех начальных этапов усвоения ксилозы — ксилоредуктазу, ксилитолдегидрогеназу и ксилулокиназу соответственно [11]. Установлено также, что существенной проблемой для эффективной алкогольной ферментации ксилозы у дрожжей является дисбаланс никотинамидных коферментов, который возникает вследствие того, что фермент первого этапа утилизации ксилозы, ксилоредуктаза, является NADPH-зависимым, а ксилитолдегидрогеназа (фермент второго этапа) — NAD-зависимой. Такой дисбаланс приводит к снижению эффективности синтеза этанола и накоплению ксилита в среде [11]. Образование побочного продукта — ксилита — можно уменьшить за счет замены кофакторного

средства ксилоредуктазы [12]. Удалось достичь существенного прогресса при гетерологической экспрессии генов бактерий и грибов, кодирующих ксилоизомеразу (этот фермент превращает ксилосу в ксилулозу и не требует кофакторов) в клетках *S. cerevisiae* [13, 14].

Для дрожжей *S. cerevisiae* установлено, что усиление экспрессии генов неокислительной части пентозофосфатного пути играет существенную роль для оптимизации алкогольной ферментации пентоз [15]. Установлена также зависимость эффективности алкогольной ферментации ксилосы от функционирования компонентов дыхательной цепи. Мутанты дрожжей *P. stipitis* с поврежденными генами, кодирующими цитохром *c* и SHAM-чувствительную терминальную оксидазу, синтезировали повышенные количества этанола [16, 17]. Важным направлением исследований является идентификация и модификация специфических транспортеров пентоз для эффективного кометаболизма смеси сахаров (глюкозы и пентоз) [18]. Для повышения способности рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae* одновременно метаболизировать смесь сахаров был предложен новый метод эволюционной инженерии, базирующийся на длительном культивировании рекомбинантных штаммов на различных сахарах [19].

Однако несмотря на значительные усилия и определенные успехи, предпринимаемые в области алкогольной ферментации основных сахаров лигноцеллюлозных гидролизатов (и ксилосы в частности), достигнуть эффективного экономически выгодного сбраживания этих субстратов как природными, так и рекомбинантными штаммами микроорганизмов пока не удается. Для получения этанола из лигноцеллюлозных гидролизатов в промышленных масштабах необходимо дальнейшее совершенствование лучших на данный момент дрожжевых штаммов, среди которых штаммы дрожжей *H. polymorpha* рассматриваются как одни из наиболее перспективных. Ниже представлены основные результаты в области метаболической инженерии *H. polymorpha*, в основном полученные в лаборатории авторов в Институте биологии клетки НАН Украины и направленные на создание улучшенных продуцентов этанола из ксилосы, крахмала, ксилана и глицерина, а

также штаммов с повышенной толерантностью к высокой температуре и этанолу.

Институт биологии клетки НАН Украины располагает рядом общедоступных коллекционных штаммов *H. polymorpha*, а также штаммов, выделенных на территории бывшего Советского Союза в 1970-х годах, в результате поиска метилотрофных дрожжей как потенциального источника кормового белка. В результате биохимического анализа восьми штаммов *H. polymorpha* установлено, что все проанализированные штаммы сбраживают в этанол глюкозу, ксилосу, маннозу, мальтозу и целлобиозу, тогда как галактоза и L-арабиноза практически не поддерживают рост этого вида дрожжей. Оптимальной температурой для ферментации глюкозы и ксилосы является 37–40 °С, однако даже при 45–48 °С она оставалась достаточно интенсивной, что является абсолютным рекордом для эукариотической алкогольной ферментации. Наиболее активно ферментация происходила в условиях умеренной аэрации, а также голодания клеток по флавинам, необходимым для клеточного дыхания. *H. polymorpha* оказалась более устойчивой к токсическому действию этанола по сравнению с *P. stipitis*, однако более чувствительной, чем *S. cerevisiae* [1].

#### **Разработка ауксонографического метода селекции штаммов *H. polymorpha* с улучшенными параметрами алкогольной ферментации ксилосы**

Для селекции мутантов с повышенной (или пониженной) продукцией этанола важно разработать простой и надежный метод качественной детекции этанола, образованного дрожжевыми колониями при их росте на агаризованной среде. Ауксонография – это группа микробиологических методов, основанных на использовании тестерных культур – микробных штаммов с определенными ростовыми характеристиками для определения действия антибиотиков, мутагенной активности препаратов, способности микроорганизмов расщеплять сахара или другие органические вещества. Для селекции мутантов *H. polymorpha*, способных к повышенному синтезу этанола в среде с ксилосой, разработан простой ауксонографический метод [20]. Метод основывается на способности

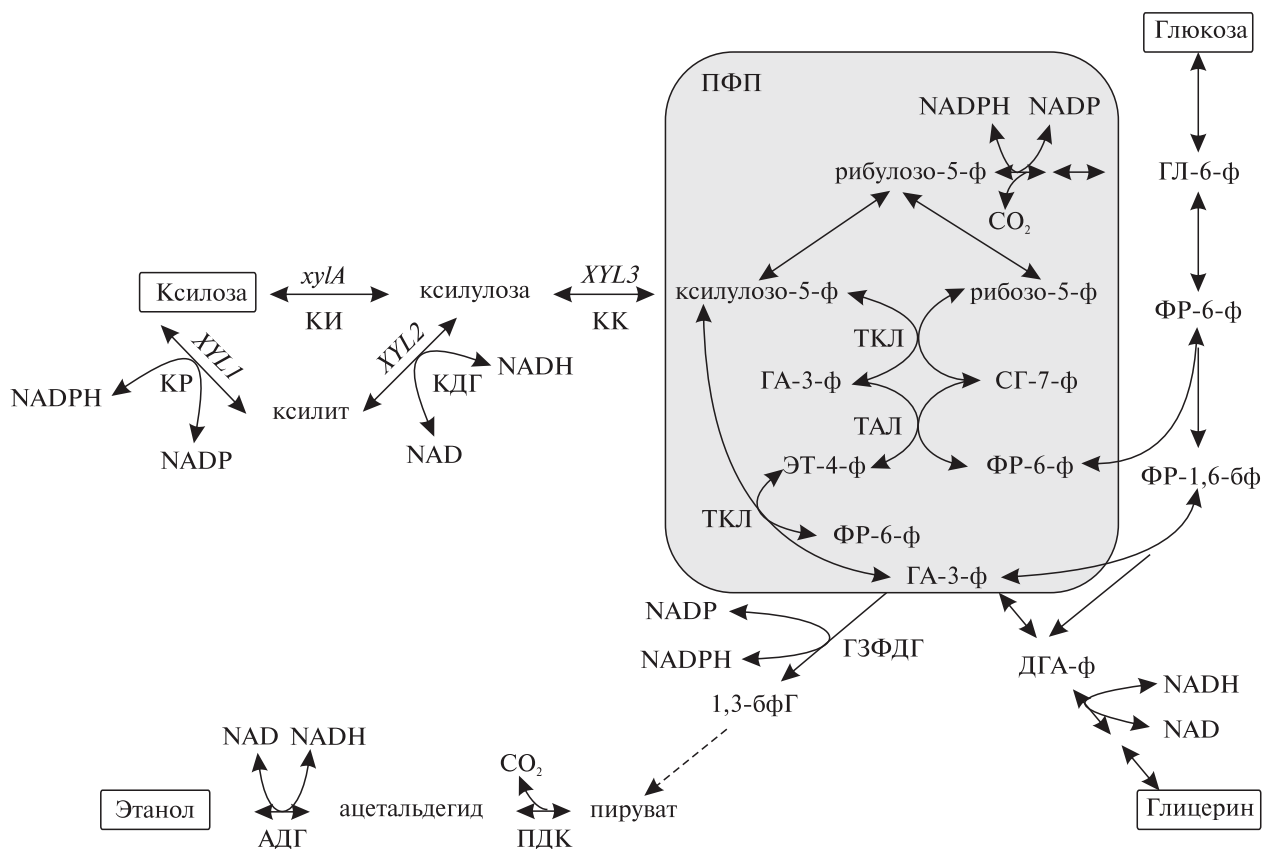


дрожжей *H. polymorpha* расти в среде с ксилозой и превращать этот сахар в этанол. Мутантный же штамм *H. polymorpha*  $\Delta xyl1$  с поврежденной ксилоредуктазой не растет на среде с ксилозой, однако эффективно усваивает этанол в качестве источника углерода и энергии. Таким образом, при росте колоний дрожжей, усваивающих ксилозу, на агаризованной среде с этой пентозой в качестве единственного источника углерода, смешанной с жизнеспособными клетками штамма  $\Delta xyl1$ , последние будут образовывать зоны роста вокруг колоний, продуцирующие этанол из ксилозы. И чем больше этанола синтезирует колония, тем больше будет зона роста штамма  $\Delta xyl1$ , который в данном случае является тестерной культурой. И наоборот, зона роста штамма  $\Delta xyl1$  будет незначительной либо вовсе отсутствовать вокруг колоний, которые синтезируют этанол неэффективно или не производят его вообще. С помощью разработанного метода удалось селекционировать коллекцию УФ-индуцированных мутантов, способных к улучшенной алкогольной ферментации ксилозы. Биохимический анализ одного из штаммов показал существенное снижение удельной активности ксилоредуктазы с использованием NADPH в качестве кофактора, в то время как специфическая активность ксилоредуктазы с использованием NADH оставалась на уровне штамма дикого типа [20]. Такая особенность мутантной ксилоредуктазы согласовывалась с нашими последующими работами по целенаправленному изменению сродства кофактора [21], что в конечном счете приводило к увеличению синтезированного этанола при ферментации ксилозы.

#### Метаболическая инженерия начальных этапов катаболизма ксилозы у дрожжей *H. polymorpha* с целью конструирования улучшенных продуцентов этанола

При сбраживании ксилозы в дрожжевой клетке с помощью NADPH-зависимой ксилоредуктазы (КР) происходит ее восстановление до ксилита, который далее с помощью NAD-зависимой ксилитолдегидрогеназы (КДГ) окисляется до ксилулозы (рис. 1). В результате этих окислительно-восстановительных реакций при ограниченной аэрации во время фер-

ментации происходит накопление и дисбаланс кофакторов NADP и NADH, следствием чего являются крайне низкие количества синтезированного этанола и одновременное накопление в среде побочного продукта — ксилита. КР и КДГ для устранения дисбаланса никотинамидных кофакторов были замещены бактериальной ксилозиомеразой (КИ), которая непосредственно конвертирует ксилозу в ксилулозу и не требует кофакторов (рис. 1). С этой целью были сконструированы штаммы *H. polymorpha* с делециями генов *XYL1*, *XYL2-A* и *XYL2-B*, кодирующие КР и два паралога КДГ соответственно. Делеция гена *XYL1* полностью подавляла активность КР, тогда как делеция гена *XYL2-A* лишь уменьшала активность КДГ на 30 %. Дополнительная делеция гена *XYL2-B* снижала активность КДГ на 65 % [22]. Далее в геном реципиентного штамма  $\Delta xyl1\Delta xyl2-A\Delta xyl2-B$  были введены гены *xylA*, кодирующие КИ *Escherichia coli* и *Streptomyces coelicolor*, в результате чего у трансформантов формировались функционально активные гетерологические ферменты. Присутствие гетерологического белка КИ *E. coli* в клетках сконструированных штаммов подтверждено при помощи визуализации дополнительных линий с молекулярной массой 46 кДа, которые соответствуют теоретически рассчитанной массе КИ, на электрофореграммах бесклеточных экстрактов рекомбинантных штаммов в денатурирующих условиях [23]. Удельная активность КИ рекомбинантных штаммов достигала 80 % удельной активности фермента в клетках бактерий *E. coli*. Сконструированные дрожжевые штаммы росли на питательной среде с ксилозой в качестве единственного источника углерода, однако эффективность алкогольной ферментации ксилозы оставалась на уровне штамма дикого типа. Повышению алкогольной ферментации ксилозы способствовало дополнительное усиление экспрессии гомологического гена *XYL3*, кодирующего ксилулокиназу (КК). Рекомбинантный штамм, коэкспрессирующий гены *xylA E. coli* и *XYL3 H. polymorpha*, характеризовался двукратным увеличением удельной активности КК, а также повышением уровня алкогольной ферментации ксилозы в 3,5–4 раза по сравнению со штаммом дикого типа (табл. 1) [22].



**Рис. 1.** Пути сбраживания ксилозы, глюкозы и глицерина до этанола у дрожжей. ПФП – пентозофосфатный путь, ГЛ-6-ф – глюкозо-6-фосфат, ФР-6-ф – фруктозо-6-фосфат, ФР-1,6-бф – фруктозо-1,6-бисфосфат, ГА-3-ф – глицеральдегид-3-фосфат, СГ-7-ф – седогептулозо-7-фосфат, ЭТ-4-ф – эритрозо-4-фосфат, 1,3-бфГ – 1,3-бисфосфоглицерат, ДГА-ф – дигидроксиацетонфосфат, КР – ксилозоредуктаза, КДГ – ксилитолдегидрогеназа, КИ – ксилоизомераза, КК – ксилулокиназа, ТКЛ – транскетолаза, ТАЛ – трансальдолаза, ГЗФДГ – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ПДК – пируватдекарбоксилаза, АДГ – алкогольдегидрогеназа

**Таблица 1.** Продуктивность синтеза этанола на четвертые сутки ферментации, удельная активность КК и КИ у рекомбинантных и контрольных штаммов

| Штамм                                    | Продуктивность синтеза этанола |            |            |             | Удельная активность, МЕ/мг белка |               |
|--|--------------------------------|------------|------------|-------------|----------------------------------|---------------|
|  | 37 °С                          |            | 48 °С      |             | КК                               | КИ            |
|  | мг/(л·ч)                       | мг/(л·г·ч) | мг/(л·ч)   | мг/(л·г·ч)  |                                  |               |
| <i>Δxyl1Δxyl2-A(xylA)</i>                | 1,5 ± 0,07                     | 0,6 ± 0,03 | 1,4 ± 0,07 | 0,58 ± 0,03 | 0,060 ± 0,003                    | 0,015 ± 0,001 |
| <i>Δxyl1Δxyl2-Δxyl2-B(xylA)</i>          | 1,7 ± 0,08                     | 0,7 ± 0,03 | 1,6 ± 0,08 | 0,67 ± 0,03 | 0,061 ± 0,003                    | 0,050 ± 0,003 |
| <i>Δxyl1Δxyl2-Δxyl2-B(EcxylA/HpXYL3)</i> | 5,1 ± 0,25                     | 2,1 ± 0,11 | 5,9 ± 0,29 | 2,5 ± 0,12  | 0,145 ± 0,007                    | 0,049 ± 0,002 |
| <i>CBS4732 leu2-2 (wt)</i>               | 1,5 ± 0,07                     | 0,6 ± 0,03 | 1,4 ± 0,07 | 0,58 ± 0,03 | 0,07 ± 0,004                     | 0             |
| <i>E. coli</i>                           | –                              | –          | –          | –           | –                                | 0,062 ± 0,003 |

**Примечание.** Во всех таблицах: «–» не определяли; [мг/(л·ч)] – количество этанола (мг), синтезируемого в 1 л среды за 1 ч; [мг/(л·г·ч)] – количество этанола (мг), синтезируемого в 1 л среды за 1 ч с 1 г ксилозы; МЕ – международные единицы измерения активности фермента.

КР дрожжей *H. polymorpha* при ферментативной реакции способна в качестве кофакторов использовать как NADPH, так и NADH. Однако сродство КР к NADH существенно ниже, чем к NADPH. В связи с этим иной подход устранения дисбаланса кофакторов, создающийся в результате действия КР и КДГ, заключался в снижении сродства КР к NADPH. С помощью сайт-специфического мутагенеза сконструирована модифицированная форма КР, в которой лизин и аспарагин в положениях 341 и 343 были заменены аргинином и аспарагиновой кислотой соответственно. При использовании NADPH в качестве кофактора активность модифицированной КР снизилась в 9 раз по сравнению с активностью нативной формы КР, в то же время при использовании NADH активность КР оставалась без изменений в обоих случаях. Таким образом, в результате модификации первичной структуры белка сродство КР к NADPH уменьшилось в 17 раз по сравнению с нативной формой фермента, тогда как сродство модифицированной формы КР к NADH оставалось без изменений. Сконструирован рекомбинантный штамм *H. polymorpha* с усиленной экспрессией модифицированной формы КР, а также нативных КДГ и КК, который характеризовался увеличением уровня алкогольной ферментации ксилозы в 7,4 раза и одновременным снижением уровня продукции

ксилита в 5 раз по сравнению со штаммом дикого типа (табл. 2) [21]. При ферментации ксилозы рекомбинантный штамм *H. polymorpha* с усиленной экспрессией модифицированной формы КР и нативных КДГ и КК существенно превосходил по количеству синтезированного этанола рекомбинантный штамм, конвертирующий ксилозу с помощью бактериальной КИ и нативной КК. Сконструированные рекомбинантные штаммы *H. polymorpha* с повышенной продуктивностью синтезированного этанола при ферментации ксилозы могут использоваться в качестве исходных микроорганизмов для дальнейшего увеличения эффективности алкогольной ферментации основных сахаров лигноцеллюлозных гидролизатов при повышенной температуре с помощью методов метаболической инженерии.

**Метаболическая инженерия заключительных этапов синтеза этанола в процессе ферментации**

Пируватдекарбоксилаза (ПДК) является ключевым ферментом алкогольной ферментации. Этот фермент катализирует превращение пирувата в уксусный альдегид и CO<sub>2</sub> (рис. 1). У *S. cerevisiae* (Крэбтри-положительные дрожжи) метаболизм уксусного альдегида зависит от присутствия кислорода. Пируват либо окисляется до ацетил-КоА ферментами ПДК комплекса, либо же восстанавливается до этанола ПДК и

Таблица 2. Удельные активности КР, КДГ и КК и продуктивность синтеза этанола и ксилита у рекомбинантных штаммов *H. polymorpha* на первые сутки ферментации

| Штамм                      | Удельная активность, МЕ/мг белка            |  |               |               | Продуктивность, мг/(л·ч)/мг/(л·г·ч) |                            |
|----------------------------|---|--|---------------|---------------|-------------------------------------|----------------------------|
|                            | КР  |  | КДГ           | КК            | Этанол                              | Ксилит                     |
|                            | NADPH(H <sup>+</sup> )/K <sub>M</sub> (мкМ) | NADH(H <sup>+</sup> )/K <sub>M</sub> (мкМ) |               |               |                                     |                            |
| КРН                        | 0,091 ± 0,005/<br>9 ± 0,5                   | 0,016 ± 0,001/<br>100 ± 5,5                | 0,551 ± 0,035 | —             | 6,3 ± 0,25/<br>2,75 ± 0,11          | 3,4 ± 0,6/<br>1,56 ± 0,08  |
| КРМ                        | 0,01 ± 0,001/<br>152 ± 8,4                  | 0,014 ± 0,001/<br>112 ± 6,5                | 0,504 ± 0,028 | —             | 9,8 ± 0,42/<br>4,45 ± 0,19          | 3,2 ± 0,14/<br>1,45 ± 0,07 |
| КРН/КДГ/КК                 | —   | —  | —             | 0,375 ± 0,021 | 13,8 ± 0,6/<br>6,4 ± 0,29           | 2,8 ± 0,14/<br>1,3 ± 0,06  |
| КРМ/КДГ/КК                 | —   | —  | —             | 0,366 ± 0,019 | 54,7 ± 2,7/<br>21,9 ± 1,1           | 0,9 ± 0,03/<br>0,36 ± 0,02 |
| CBS4732 <i>leu2-2</i> (wt) | 0,034 ± 0,025/<br>7 ± 0,4                   | 0,012 ± 0,001/<br>85 ± 4,7                 | 0,697 ± 0,049 | 0,156 ± 0,009 | 7,5 ± 0,36/<br>3,3 ± 0,16           | 4,2 ± 0,21/<br>1,8 ± 0,1   |

алкогольдегидрогеназой [24]. Попытки сверхэкспрессии гена *PDC1*, кодирующего ПДК, у *S. cerevisiae* не улучшали выход этанола при сбраживании глюкозы [25, 26].

*H. polymorpha* являются строго аэробными, Крэбтри-негативными дрожжами, накапливающими максимальные количества этанола в условиях ограниченной аэрации. В таких условиях повышение активности ПДК может иметь ключевое значение в распределении пирувата между пируватдегидрогеназой и ПДК. Для подтверждения этой гипотезы ген *PDC1 H. polymorpha*, кодирующий ПДК, клонирован, а также изучен эффект сверхэкспрессии этого гена на процесс алкогольной ферментации основных сахаров лигноцеллюлозы. При введении экспрессионной кассеты с геном *PDC1* под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *GAPDH* в составе плазмиды для мультикопийной интеграции в геном реципиентного штамма *H. polymorpha* происходило 40-кратное увеличение удельной активности ПДК. Вместе с тем сконструированный рекомбинантный штамм характеризовался увеличением уровня алкогольной ферментации ксилозы в 2 раза по сравнению с исходным штаммом. Уровень алкогольной ферментации глюкозы был также увеличен в 2 раза (табл. 3). Схожие результаты увеличения уровня продукции этанола из глюкозы и ксилозы в условиях оптимальной (37 °С) и повышенной температуры (48 °С) получены при усилении экспрессии гетерологического гена *PDC1 Kluyveromyces lactis* в системе *H. polymorpha* [27].

Таким образом, сверхэкспрессия гена *PDC1* может использоваться как один из подходов

для конструирования улучшенных продуцентов этанола *H. polymorpha* из гидролизатов лигноцеллюлозы в условиях повышенной температуры.

Дрожжевая алкогольдегидрогеназа (АДГ) – фермент, катализирующий завершающую метаболическую реакцию при алкогольной ферментации. АДГ катализирует обратимую реакцию восстановления уксусного альдегида в этанол с сопутствующим окислением NADH (рис. 1). Последовательности *ADH* генов довольно консервативны у дрожжей, однако регуляция, физиологические функции, количество генов отличаются у разных видов. По семь *ADH* генов (*ADH1–ADH7*) идентифицировано у *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, а также у *H. polymorpha*, тогда как у *Kluyveromyces lactis* обнаружено лишь четыре *ADH* гена (*ADH1–ADH4*) [28]. Среди них гены *ADH1* и *ADH2 S. cerevisiae* и их белковые продукты изучены детально, так как они играют ключевую роль в алкогольной ферментации, а именно в синтезе и утилизации этанола соответственно [29, 30]. В отличие от пекарских дрожжей, *Adh1p P. stipitis* активируется как при ограничении аэрации (условия ферментации), так и при росте на дыхательном субстрате – этаноле [31, 32]. При сравнении каталитических характеристик АДГ разных видов дрожжей установлено, что *Adh1p H. polymorpha* проявляет повышенную каталитическую активность при окислении этанола и схожий уровень восстановления уксусного альдегида [28]. Делеция гена *ADH1 H. polymorpha* вызывала снижение синтеза этанола при ферментации как глюкозы, так и глицерина. Усиление экспрессии гена *ADH1* на фоне делеционного штамма приводило

Таблица 3. Ферментация различных источников углерода штаммами *H. polymorpha* при 48 °С в условиях ограниченной аэрации (140 об/мин) в средах YNB с 12 % арабинозы, 12 % ксилозы и 12 % глюкозы

| Штамм                       | L-арабиноза |             |                             | D-ксилоза |             |                             | D-глюкоза |             |                             |
|-----------------------------|-------------|-------------|-----------------------------|-----------|-------------|-----------------------------|-----------|-------------|-----------------------------|
|                             | OD, λ600    | этанол, г/л | ПДК активность, МЕ/мг белка | OD, λ600  | этанол, г/л | ПДК активность, МЕ/мг белка | OD, λ600  | этанол, г/л | ПДК активность, МЕ/мг белка |
| NCYC495 (wt)                | 10,5        | 0,0         | 0,4 ± 0,06                  | 8,24      | 0,7 ± 0,05  | 0,1 ± 0,02                  | 12,4      | 14,4 ± 0,9  | 0,21 ± 0,03                 |
| PDC1Hp                      | 11,2        | 0,0         | 9,2 ± 0,5                   | 11,0      | 1,2 ± 0,1   | 4,1 ± 0,2                   | 13,0      | 27,9 ± 1,3  | 3,2 ± 0,15                  |
| 2EthOH <sup>-</sup>         | 10,68       | 0,0         | 0,07 ± 0,01                 | 11,1      | 0,9 ± 0,2   | 0,21 ± 0,06                 | 11,6      | 7,8 ± 0,4   | 0,26 ± 0,04                 |
| 2EthOH <sup>-</sup> /PDC1Hp | 11,12       | 0,0         | 0,88 ± 0,04                 | 14,1      | 1,6 ± 0,1   | 2,2 ± 0,2                   | 16,2      | 10,8 ± 0,7  | 2,9 ± 0,15                  |



к двукратному увеличению количества синтезируемого этанола при ферментации глюкозы и незначительному улучшению конверсии глицерина в этанол [28]. Конструирование дрожжевых штаммов, эффективно конвертирующих глицерин до этанола, вызывает все больший интерес, так как глицерин образуется в больших количествах в качестве побочного продукта при производстве биодизеля.

#### **Исследование роли гена *ATH1* в термотолерантности и мобилизации трегалозы у *H. polymorpha***

Трегалоза играет существенную роль в обеспечении термотолерантности *H. polymorpha*. У этих и других дрожжей синтез трегалозы является одним из элементов ответа на тепловой шок. Reinders et al. [33] установили, что при потере активности трегалозо-6-фосфатсинтазы (первого фермента пути синтеза трегалозы) клетки *H. polymorpha* не способны синтезировать трегалозу и становятся чувствительными к тепловому шоку. Однако для *H. polymorpha* влияние увеличения внутриклеточного уровня трегалозы на термотолерантность ранее не исследовалось. Метаболизм трегалозы детально изучен у дрожжей *S. cerevisiae*, у которых внутриклеточный уровень трегалозы поддерживается благодаря сбалансированному действию ферментов синтеза и гидролиза этого сахара [34]. В гидролизе трегалозы участвуют два фермента – кислая трегалаза (кодируется геном *ATH1*) и нейтральная трегалаза (кодируется геном *NTH1*) [35]. Кислая трегалаза необходима для роста *S. cerevisiae* в среде с трегалозой в качестве единственного источника углерода и энергии [36]. Делеция гена *ATH1* у *S. cerevisiae* в большей степени увеличивает уровень внутриклеточной трегалозы, чем делеция гена *NTH1* [34]. Установлено, что *Δath1* мутант *S. cerevisiae* менее чувствительный к таким стрессовым факторам, как высушивание, инкубация при низкой температуре, этанольный и осмотический стрессы [34, 37]. Снижение активности кислой трегалазы у *S. cerevisiae* повышает толерантность к этанолу и увеличивает продуктивность алкогольной ферментации [38].

Для определения роли гена *ATH1* в термотолерантности и мобилизации трегалозы у *H. polymorpha* сконструирован штамм *Δath1*

с делецией соответствующего гена. Как и мутант *Δath1 S. cerevisiae*, штамм *Δath1 H. polymorpha* не растет в среде с трегалозой в качестве единственного источника углерода и энергии. В результате потери активности кислой трегалазы мутант *Δath1 H. polymorpha* накапливает в клетках в 1,5–2,3 раза больше трегалозы в сравнении со штаммом дикого типа в условиях оптимальной и повышенной температур. Увеличение внутриклеточного уровня трегалозы у *H. polymorpha* оказывало положительный эффект на термотолерантность клеток, поскольку у мутанта *Δath1 H. polymorpha* в 2 раза повышалась устойчивость к тепловому шоку, а продукция этанола при сбраживании ксилосы увеличивалась в 6 раз при температуре 50 °C [7].

#### **Повышение термотолерантности рекомбинантных штаммов *H. polymorpha* с усиленной экспрессией белков теплового шока Hsp16p и Hsp104p**

Низкомолекулярные белки теплового шока принадлежат к подсемейству белков с молекулярной массой мономеров от 12 до 43 кДа [39]. Белки теплового шока супрессируют агрегацию денатурированных белков, а также облегчают взаимодействие поврежденных белков с другими шаперонами для восстановления нативной структуры [40]. Показано, что низкомолекулярный белок теплового шока Hsp16p *S. pombe* необходим для экспорта мРНК в условиях теплового шока [41]. Ортолог этого белка дрожжей *S. cerevisiae*, Hsp42p, является типичным цитозольным белком теплового шока, выполняющим функцию шаперона в условиях нормальной и повышенной температур [42]. Ближайший идентифицированный гомолог Hsp16p *H. polymorpha* соответствующего белка *S. pombe* имеет молекулярную массу 36,2 кДа.

Белок Hsp104p является представителем AAA<sup>+</sup> подсемейства белков теплового шока, участвующих в структурных перестройках белков и белковых комплексов [43]. Белок теплового шока Hsp104p *S. cerevisiae* восстанавливает структуру денатурированных белков, используя энергию АТФ и систему ко-шаперонов Hsp70p/Hsp40p [44]. Экспрессия Hsp104p *S. cerevisiae* невелика при нормальной температуре и значительно возрастает при повышении температуры [45]. Белок теплового шока Hsp104p

играет критическую роль в выживании клеток при культивировании дрожжей в условиях экстремальных температур [46]. Экспрессия этого гена обеспечивает термотолерантность клеток *S. cerevisiae* [45]. Hsp104p является высококонсервативным белком. Аминокислотная последовательность Hsp104p *H. polymorpha* составляет 64 % гомологии Hsp104p *S. cerevisiae*. Guerra et al. [47] установили, что экспрессия Hsp104p *H. polymorpha* подобно *S. cerevisiae* индуцируется повышением температуры.

Для проверки влияния сверхсинтеза белков теплового шока на термотолерантность и высокотемпературную ферментацию *H. polymorpha* сконструированы штаммы с усиленной экспрессией гомологических генов *HSP16* и *HSP104* под контролем промотора гена *GAPDH*. Трансформанты, содержащие экспрессионные кассеты *HSP16* и *HSP104*, характеризовались повышением уровня выживания в условиях теплового шока в 2 и 10 раз соответственно. Синергичный эффект комбинирования сверхэкспрессии Hsp16p и Hsp104p проявлялся в 12-кратном повышении уровня выживания в условиях теплового шока [7].

Исследование высокотемпературной ферментации ксилозы показало, что штаммы *H. polymorpha*, сверхэкспрессирующие гены белков теплового шока, характеризуются улучшенными параметрами алкогольной ферментации, в частности, эти штаммы продуцируют в 3–6 раз больше этанола при максимальной для *H. polymorpha* температуре 50 °С. При более низких температурах (37 и 48 °С) уровень продукции этанола у трансформантов *HSP* был на уровне контрольного штамма. Поскольку 50 °С является максимальной температурой, которую выдерживает *H. polymorpha*, и рост при такой температуре существенно угнетен, мы предполагаем, что в данных условиях значительная часть белков клетки денатурирует. Это предположение позволяет объяснить позитивный эффект сверхэкспрессии генов *HSP* при ферментации ксилозы при температуре 50 °С [7].

#### **Идентификация генов *H. polymorpha*, определяющих устойчивость к этиловому спирту**

Для клонирования генов *H. polymorpha*, обеспечивающих устойчивость к этиловому спирту, проведены эксперименты с использованием

инсерционного мутагенеза. После трансформации реципиентного штамма *H. polymorpha* инсерционной кассетой создана коллекция трансформантов, в которых кассета встраивалась в случайные хромосомные локусы. Определена минимальная токсическая концентрация этанола, угнетающая рост *H. polymorpha*, которая составила 7 %. После скрининга трансформантов на среде с повышенной концентрацией этанола селекционирован инсерционный мутант *H. polymorpha* (7E), неспособный расти на такой среде. Штамм 7E в 300–500 раз чувствительнее к экзогенному этанолу, чем реципиентный штамм. Введенная мутация не повреждает катаболизм этанола, а лишь влияет на механизмы устойчивости к повышенным концентрациям этого спирта.

Анализ нуклеотидных последовательностей, фланкирующих инсерционную кассету, выявил повреждение гена с достаточно высокой степенью гомологии (39 %) к гену *MPE1* *S. cerevisiae*. Ген *MPE1* *S. cerevisiae* кодирует жизненно важный белок, являющийся компонентом фактора расщепления и полиаденилирования мРНК при ее созревании. В отличие от *S. cerevisiae*, *MPE1* *H. polymorpha* не является жизненно необходимым геном, а отвечает за резистентность к этанолу. В связи с этим идентифицированному гену *H. polymorpha* присвоено новое название: *ETT1* (ethanol tolerance – толерантность к этанолу), а мутант 7E соответственно обозначен как *ett1*. *MPE1* *S. cerevisiae* не комплементирует мутацию *ett1* *H. polymorpha*, однако частичную комплементацию обеспечивал ген *MPE1* дрожжей *P. stipitis*, ферментирующих ксилозу до этанола. Полученные данные указывают, что Mpe1p *P. stipitis*, подобно Ett1p *H. polymorpha*, отвечает за устойчивость к этанолу, а Mpe1p *S. cerevisiae*, очевидно, не выполняет такой функции. Установлено, что аминокислотные последовательности генов *MPE1* *S. cerevisiae*, *ETT1* *H. polymorpha* и *MPE1* *P. stipitis* содержат общие консервативные домены: убиквитин-подобный DWNN-домен и мотив «цинкового пальца». Отличия выявлены при детальном анализе DWNN-доменов белков *S. cerevisiae*, *P. stipitis* и *H. polymorpha*. Согласно аминокислотным последовательностям DWNN-домен имеет гомологию к убиквитину и мо-

жет принимать участие в процессе ковалентной модификации белков убиквитином [48]. Известно, что убиквитин содержит консервативные аминокислотные остатки лизина (K), являющиеся сайтами присоединения дополнительных молекул убиквитаина, что благоприятствует формированию полиубиквитиновых цепей [49]. Цепи убиквитаина, связанные с K48, K11 и K29, распознаются 26S-протеасомой, после чего происходит деградация модифицированного убиквитином белка. Цепи, связанные с K6 и K63, участвуют в многочисленных непротеолитических процессах, например, в ответе на стресс, репарации ДНК и эндоцитозе [50]. Убиквитин содержит также два консервативных остатка глицина (мотив GG) на С-конце молекулы. Мотив GG является сайтом распознавания протеазы, которая расщепляет связь между аминокислотными остатками глицина и запускает процесс конъюгации убиквитаина [48]. Сравнение аминокислотной последовательности убиквитаина с DWNN-доменами Mpe1p *S. cerevisiae*, P. stipitis и Ett1p *H. polymorpha* обнаружило отличия в консервативных остатках аминокислот, характерных для убиквитаина. Домен DWNN Ett1p *H. polymorpha* содержит мотив GG и K6, у *P. stipitis* присутствует лишь K6, тогда как у *S. cerevisiae* соответствующие консервативные остатки убиквитаина отсутствуют вообще. Эти данные могут объяснить, почему ген *MPE1 P. stipitis*, а не соответствующий гомолог *S. cerevisiae*, частично комплементирует мутацию *ett1 H. polymorpha*.

Для изучения влияния экспрессии *ETT1* на устойчивость *H. polymorpha* к этиловому спирту сконструирован штамм с усиленной экспрессией соответствующего гена. Сверхэкспрессия гена *ETT1* существенно увеличивала резистентность *H. polymorpha* к этанолу, что приводило к 10- и 3-кратному улучшению роста на агаризованной и жидкой средах с этанолом соответственно.

Кроме устойчивости к этанолу, ген *ETT1 H. polymorpha* также отвечает за устойчивость к различным формам стресса. Штамм *H. polymorpha* с усиленной экспрессией *ETT1* проявляет повышенную резистентность к денатурирующему агенту азетидин-2-карбоксилевой кислоте (Azetidine-2-carboxylic acid, AZC), тепловому шоку, а также характеризуется улуч-

шенной кинетикой роста при повышенных температурах 49 и 50 °C. Мутант *ett1* не способен расти при повышенной температуре. Количество синтезированного этанола этим штаммом при ферментации ксилитозы оказалось несколько сниженным.

Ett1p *H. polymorpha* также принимает участие в поддержании целостности клеточной стенки, поскольку мутант *ett1* не растет в среде с додецилсульфатом натрия (SDS), а штамм с усиленной экспрессией *ETT1* характеризуется улучшенным ростом. Так как сверхэкспрессия гена *ETT1* у *H. polymorpha* сопровождается повышенной резистентностью к ряду стрессовых факторов, таких как повышенная температура, этанол, AZC и SDS, вызывающие денатурацию белков, следует предположить, что экспрессия *ETT1* особенно важна в условиях белковой денатурации. Это предположение подтверждают данные ростовых характеристик штаммов *H. polymorpha* в среде с рапамицином. Штамм *H. polymorpha* с усиленной экспрессией *ETT1* проявляет повышенную устойчивость к рапамицину. Известно, что рапамицин ингибирует протеинкиназу TOR (target of rapamycin), которая участвует в клеточном ответе на голодание. В условиях истощения питательных веществ сигнальные пути протеинкиназы TOR и протеинкиназы A кооперативно блокируют клеточный цикл и активируют ответ клетки на стресс [51].

#### Гетерологическая экспрессия гена *MPR1 S. cerevisiae* в дрожжах *H. polymorpha*

Кроме денатурации белков и изменения текучести плазматической мембраны, этанол повышает уровень образования свободных радикалов кислорода [52]. Ген *MPR1 S. cerevisiae*, кодирующий ацетилтрансферазу, участвует в защите дрожжевой клетки от свободных радикалов кислорода в условиях этанольного стресса [53]. Поскольку геном *H. polymorpha* не содержит генов, гомологичных ацетилтрансферазе пекарских дрожжей, исследовалось влияние гетерологичного гена *MPR1 S. cerevisiae* на толерантность *H. polymorpha* к повышенной концентрации этанола. Сконструирована экспрессионная кассета, содержащая ген *MPR1 S. cerevisiae* под контролем сильного конститутивного промотора гена *GAPDH*, которую впоследствии ввели в геном *H. polymorpha*.

Трансформанты *H. polymorpha*, экспрессирующие *MPRI S. cerevisiae*, приобретали повышенную резистентность к AZC и этанолу в сравнении с исходным штаммом. Уровень резистентности коррелировал с количеством копий экспрессионной кассеты в геноме трансформантов. Трансформанты, содержащие три копии гена *MPRI S. cerevisiae*, более устойчивы к AZC и этанолу, чем интегранты, несущие одну копию этого гена. Таким образом, устойчивость *H. polymorpha* к этилового спирту может быть усилена за счет сверхэкспрессии гетерологичного гена *MPRI*, кодирующего ацетилтрансферазу.

#### **Прямая конверсия крахмала либо ксилана в этанол с помощью рекомбинантных штаммов *H. polymorpha***

Прямая микробная конверсия углеводов полимеров в этанол является перспективной технологией, которая может обеспечить рентабельное производство спирта из лигноцеллюлозного сырья. Одной из ключевых предпосылок для развития этой технологии является поиск, селекция либо конструирование микроорганизмов, сбраживающих крахмал и ксилан до этанола при повышенных температурах [54]. Оптимальная температура действия гидролитических ферментов, которые могут использоваться при прямой микробной конверсии полимеров в этанол, составляет около 50 °С. Однако большинство микроорганизмов, использующихся для конструирования продуцентов этанола из лигноцеллюлозных и крахмалистых субстратов, являются мезофилами с оптимальной температурой роста и ферментации в пределах 28–40 °С [55]. Накапливаемые после обработки зерна и кукурузы остатки содержат значительное количество крахмала. Например, пшеничные отруби состоят из 35 % гемицеллюлозы, 18 % целлюлозы и 20 % крахмала [56]. Пшеничные отруби накапливаются в больших количествах как побочный продукт производства муки. Таким образом, конструирование микробных штаммов, способных к прямой конверсии как крахмала, так и гемицеллюлозы в этанол, имеет большое экономическое значение.

Крахмал состоит из двух высокомолекулярных фракций – амилозы и амилопектина. Ми-

норный компонент крахмала (20–30 %) – амилоза, линейный полисахарид, который состоит из остатков глюкозы, объединенных  $\alpha$ -1,4-связями. Амилопектин, в свою очередь, представляет собой основную часть крахмала (70–80 %) и содержит, кроме  $\alpha$ -1,4-цепей глюкозы,  $\alpha$ -1,6-разветвленные цепи [57]. Крахмал расщепляется секреторными  $\alpha$ -амилазой и глюкоамилазой [58].  $\alpha$ -Амилаза (ЕС 3.2.1.1) катализирует расщепление внутренних  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей крахмала до мальтозы, олигосахаридов и декстринов. Глюкоамилаза (ЕС 3.2.1.3) катализирует гидролиз глюкоолигосахаридов и мальтозы до D-глюкозы. Сконструированы рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae*, сбраживающие крахмал путем экспрессии гетерологических  $\alpha$ -амилазы *Streptococcus bovis* и глюкоамилазы *Rhizopus oryzae* [59]. Дрожжи *Schwanniomyces occidentalis* синтезируют амилитические ферменты и сбраживают крахмал до этанола с высокой эффективностью [60]. Секреторная  $\alpha$ -амилаза кодируется геном *SWA2*. Ген *GAM1* кодирует секреторную глюкоамилазу. Этот ген был экспрессирован в *H. polymorpha*, что приводило к эффективной секреции гетерологичной глюкоамилазы [61]. Учитывая способность дрожжей *H. polymorpha* ферментировать глюкозу при повышенной температуре [7, 27], перспективным является конструирование рекомбинантных штаммов на основе этого организма, непосредственно сбраживающих крахмал в этанол.

Экспрессионные кассеты генов *SWA2* (кодирует секреторную  $\alpha$ -амилазу) и *GAM1* (кодирует секреторную глюкоамилазу) под контролем сильного конститутивного промотора *GAPDH* были введены в геном реципиентного штамма *H. polymorpha*. Проводилась селекция трансформантов, тестируемых по величине зон просветления (гало) крахмала. Наличие гало свидетельствует об эффективной экспрессии секреторных форм  $\alpha$ -амилазы и глюкоамилазы. Один из отобранных штаммов, формирующий самую крупную зону просветления крахмала, синтезировал более 3 г/л этанола менее чем за 48 ч при ферментации 3 % крахмала при pH 5.5 и температуре 48 °С [62].

Дальнейшее повышение амилитической активности рекомбинантных штаммов достигалось с помощью мультикопийной интегра-



ции плазмиды, содержащей экспрессионные каскады генов *SWA2* и *GAM1*. Среди коллекций полученных трансформантов отобран штамм, содержащий 8 копий этой плазмиды. Штамм формировал наибольшую зону просветления крахмала. Эффективность алкогольной ферментации крахмала была также существенно улучшена. Количество синтезированного этанола достигало 6,5 г/л, что более чем в два раза превышает эффективность алкогольной ферментации штамма, содержащего гены *SWA2* и *GAM1* в одной копии. Дополнительное усиление экспрессии гена *PDC1* (кодирует пируватдекарбоксилазу) повышало эффективность алкогольной ферментации крахмала до 9–10 г/л [62].

$\beta$ -1,4-Ксилан представляет собой гетерогенный полисахарид, присутствующий в клеточной стенке растений. Мономеры ксилозы, объединенные  $\beta$ -1,4-связями, являются основой цепи, к которой присоединяются другие сахара [63]. Гидролиз ксилана катализируют эндо- $\beta$ -1,4-ксилаза (ЕС 3.2.1.8) и  $\beta$ -D-ксилозидаза (ЕС 3.2.1.37). Эндо- $\beta$ -ксилаза катализирует гидролитическое расщепление 1,4- $\beta$ -ксилозидных связей ксилана и ксилоолигосахаридов.  $\beta$ -D-Ксилозидаза гидролизует ксилоолигосахариды до D-ксилозы [64]. Грибы рода *Trichoderma* секретируют большое количество ксиланолитических ферментов. Хорошо известен своей целлюлолитической и ксиланолитической активностью нитчатый мезофильный гриб *Trichoderma reesei* [63]. Из него выделено две основные эндоксилазы – Xyn1p и Xyn2p. При культивировании *T. reesei* на ксилане Xyn2p составляет более 50 % общего количества ксиланолитических ферментов. Представители семейства *Aspergillus* также являются эффективными продуцентами целлюлолитических и ксиланолитических ферментов. Успешная экспрессия гена *xlnD A. niger* в пекарских дрожжах обеспечивала синтез секреторной формы  $\beta$ -D-ксилозидазы [64]. Более того, с помощью коэкспрессии эндо- $\beta$ -1,4-ксилазы *T. reesei* и  $\beta$ -D-ксилозидазы *A. niger* сконструирован рекомбинантный штамм пекарских дрожжей, сбрасывающий ксилан [64].

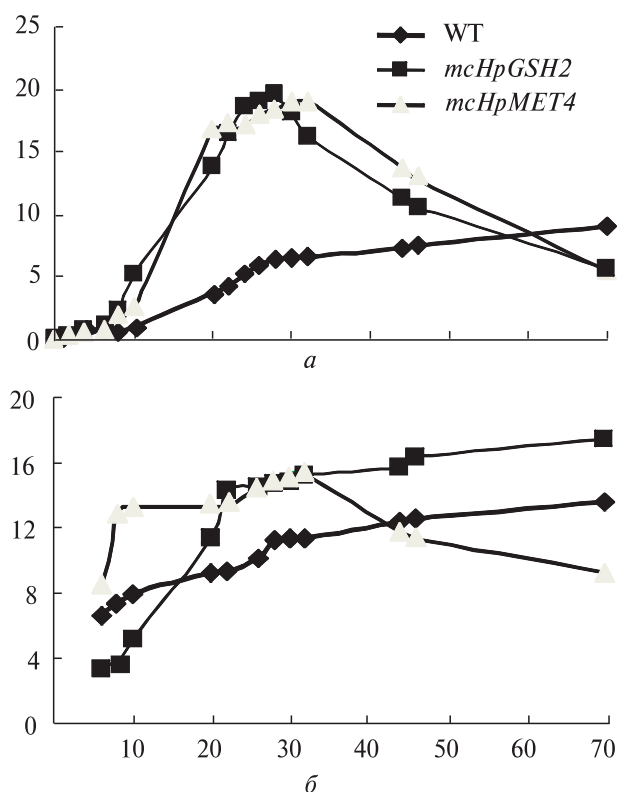
Для создания штаммов *H. polymorpha*, сбрасывающих ксилан, сконструирована интегративная плазмида, содержащая гены *XYN2 T.*

*reesei* (кодирует секреторную эндоксилазу) и *xlnD A. niger* (кодирует секреторную  $\beta$ -ксилозидазу) под контролем сильного конститутивного промотора *GAPDH*. После трансформации этой плазмидой проводили скрининг трансформантов *H. polymorpha*, анализируя размер гало на среде с добавлением ксилана или п-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилозида. Определяли также удельную активность этих ферментов, которая коррелировала с размером гало. Сконструированные штаммы приобретали способность ферментировать ксилан до этанола. Количество синтезированного этанола составляло 0,35 г/л при 37 и 48 °C [62].

В результате проведенной работы сконструированы штаммы *H. polymorpha*, обладающие способностью прямой микробной конверсии крахмала и ксилана в этанол. Сконструированные рекомбинантные штаммы являются чрезвычайно перспективными для дальнейшего улучшения параметров алкогольной ферментации углеводов полимеров и создания соответствующей промышленной технологии прямой микробной конверсии, являющейся, по видимому, наиболее эффективной технологией алкогольной ферментации биополимеров.

#### Влияние глутатиона на эффективность алкогольной ферментации *H. polymorpha*

Глутатион ( $\gamma$ -L-глутамил-L-цистеинил-глицин, GSH) – биологически активное вещество пептидной природы, играющее важную роль в широком спектре клеточных реакций [66]. Антиоксидантные свойства этого соединения определяют его роль в поддержании внутриклеточного редокс-статуса. За счет присутствия сульфгидрильных (тиоловых) групп GSH в клетке выступает как донор электронов и обеспечивает протекание реакций восстановления, при этом он переходит в окисленную форму (GSSG). Кроме поддержания тиолового редокс-статуса, глутатион участвует в детоксикации эндогенных и экзогенных реактивных металлов и ксенобиотиков. Таким образом, GSH играет важную роль в ответе клетки на окислительный стресс путем детоксикации веществ свободнорадикальной природы. Известно, что при алкогольной ферментации синтезированный этанол также вызывает окислительный стресс дрожжевых клеток [67], что



**Рис. 2.** Алкогольная ферментация штамма дикого типа (WT) *H. polymorpha* DL-1 и рекомбинантных штаммов, сверхпродуцирующих глутатион (*mcHpGSH2* и *mcHpMET4*) при культивировании на среде с добавлением 4 % глюкозы в условиях ограниченной аэрации (в ферментере) при температуре 37 °С: по вертикали – синтез этанола, г/л (а) и глутатиона нМ/мг сухой массы (б); по горизонтали – время инкубации, ч. Представлены усредненные результаты трех независимых экспериментов

в свою очередь может ограничивать эффективность алкогольной ферментации. Для исследования влияния GSH в качестве ключевого фактора в механизмах стрессового ответа на эффективность алкогольной ферментации у дрожжей *H. polymorpha* сконструированы рекомбинантные штаммы с усиленной экспрессией генов *GSH2* (кодирует  $\gamma$ -глутамилцистеинилсинтазу) [68] и *MET4* (кодирует транскрипционный активатор метаболизма серы) [69]. Штаммы, сверхэкспрессирующие *GSH2* и *MET4*, накапливали около 14 нМ GSH в пересчете на 1 мг сухого веса дрожжевой биомассы. Синтез же глутатиона у исходного штамма составлял 9 нМ/мг. Повышение

внутриклеточной концентрации GSH хорошо коррелировало с усилением эффективности алкогольной ферментации. Синтез этанола штаммами с усиленной экспрессией генов *GSH2* и *MET4* достигал 19 и 17 г/л соответственно, тогда как исходный штамм синтезировал лишь 7 г/л. Таким образом было достигнуто 2,7- и 2,4-кратное повышение эффективности алкогольной ферментации глюкозы (рис. 2). Усиление же экспрессии гомологичного гена *GSH1* (кодирует  $\gamma$ -глутамилцистеинилсинтазу) в системе *S. cerevisiae* не оказывало влияния на эффективность алкогольной ферментации глюкозы. Интересным оказался тот факт, что проанализированные штаммы *H. polymorpha* при ферментации ксилозы повышенных количеств этанола не синтезировали. Рекомбинантные штаммы дрожжей *H. polymorpha* и *S. cerevisiae* с повышенным внутриклеточным пулом GSH оказались более чувствительными к экзогенному этанолу в сравнении с соответствующими родительскими штаммами. Таким образом, глутатион стимулирует алкогольную ферментацию глюкозы дрожжей *H. polymorpha*, однако механизмы этого феномена требуют дальнейших исследований [70].

#### Влияние некоторых пероксисомных ферментов на эффективность алкогольной ферментации *H. polymorpha*

Пероксисомы – внутриклеточные органеллы, окруженные однослойной белково-липидной мембраной, присущи практически всем эукариотам. Эти органеллы, как правило, содержат ферменты  $\beta$ -окисления жирных кислот, ацил-КоА оксидазы и каталазу, выполняя жизненно важную функцию – разложение  $H_2O_2$  до воды и кислорода. У дрожжей функции пероксисом существенны, в частности, для первичного метаболизма метанола или *n*-алканов, что делает эти органеллы привлекательными в биотехнологическом аспекте. Нарушение биогенеза этих органелл у дрожжей *H. polymorpha* ухудшает рост и снижает эффективность алкогольной ферментации на среде с ксилозой в качестве источника углерода (неопубликованные данные). При нарушении биогенеза пероксисом присущие им ферменты делокализуются, теряя при этом свою активность. Предложена гипотеза, согласно которой усиление

экспрессии генов, кодирующих пероксисомные ферменты дигидроксиацетонсинтазу (ДАС, пероксисомная транскетолаза, участвующая в ассимиляции формальдегида) и трансальдолазу (ТАЛ, функция пероксисомной трансальдолазы не установлена), приведет к улучшению параметров алкогольной ферментации ксилозы. Среди всех пероксисомных ферментов лишь ДАС и, возможно, ТАЛ непосредственно вовлечены в метаболизм производных ксилозы. ДАС катализирует конденсацию ксилулозо-5-фосфата и формальдегида с образованием глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетона. Нельзя исключить также вовлечение ДАС в качестве неспецифической транскетолазы (ТКЛ) в неокислительной части пентозофосфатного пути. ТАЛ катализирует конденсацию седогептулозо-7-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата с образованием эритрозо-4-фосфата и фруктозо-6-фосфата. В норме эта реакция происходит в цитозоле, какова же функция пероксисомного фермента, как указывалось выше, не установлено. Продукты обеих реакций, глицеральдегид-3-фосфат и фруктозо-6-фосфат, являются также метаболитами гликолиза (рис. 1). Увеличение их концентрации вследствие дерепрессии ДАС и ТАЛ может стимулировать алкогольную ферментацию ксилозы. Сконструированы рекомбинантные штаммы *H. polymorpha* с усиленной экспрессией генов *DAS1* и *TAL2*, кодирующих пероксисомальные дигидроксиацетонсинтазу и трансальдолазу соответственно. Эффективность сбраживания ксилозы у штаммов с одновременным усилением экспрессии *DAS1* и *TAL2* существенно увеличивалась по сравнению со штаммами, у которых дерепрессирован лишь один из этих ферментов. Продукция этанола рекомбинантными штаммами более чем в два раза превышала количество этанола, образуемого исходным штаммом. Важно отметить, что при дерепрессии гена *TAL1*, кодирующего цитоплазматическую трансальдолазу, увеличения эффективности алкогольной ферментации ксилозы не наблюдалось. Пероксисомальные ферменты ДАС и ТАЛ вовлечены в процесс алкогольной ферментации ксилозы у *H. polymorpha*, однако функции пероксисом при алкогольной ферментации ксилозы требуют дальнейшего изучения.

Ген *VPS34 H. polymorpha*, кодирующий фосфатидилинозитол-3-киназу, вовлечен в эндоцитоз и вакуолярный сортирование белков. Мутант *Δvps34 H. polymorpha* не способен к селективной деградации пероксисом [71]. Эффективность алкогольной ферментации глюкозы штамма *Δvps34 H. polymorpha* увеличивалась в 1,7 раза в сравнении со штаммом дикого типа [70], что также свидетельствует о вовлечении пероксисом в процессе алкогольной ферментации углеродных субстратов.

### Перспективы

Можно надеяться, что дальнейшая работа в области метаболической инженерии дрожжей *H. polymorpha* позволит сконструировать штаммы, которые по параметрам алкогольной ферментации ксилозы будут превосходить все известные на сегодня штаммы микроорганизмов. Перспективными направлениями улучшения параметров алкогольной ферментации ксилозы *H. polymorpha* следует рассматривать начальные этапы катаболизма ксилозы, а также транспорт этой пентозы в клетку, амплификацию лимитирующих генов гликолиза и пентозофосфатного пути, генов, определяющих устойчивость к повышенной температуре и этанолу. Максимальная температура ферментации *H. polymorpha* (48 °C) должна обеспечить проведение процесса ООФ глюкозы и ксилозы, поскольку эта температура близка к оптимальной для действия целлюлаз и гемицеллюлаз. Недостатком *H. polymorpha* является неспособность ферментировать галактозу и L-арабинозу (следует отметить, что в коллекции микроорганизмов Института биологии клетки НАН Украины идентифицирован штамм *H. polymorpha*, растущий в среде с L-арабинозой, однако не сбраживающий этот сахар). Поэтому заданием будущей работы должно стать введение в этот организм генов из других микроорганизмов, что обеспечит активную ферментацию всех основных сахаров лигноцеллюлозы. Пока что совершенно не изученной является устойчивость *H. polymorpha* к токсическим продуктам (альдегиды, фенолы, уксусная и муравьиная кислоты), накапливающиеся в гидролизатах лигноцеллюлозы в условиях кислотного гидролиза. Впрочем, в условиях ферментативного гидролиза количест-

во таких токсических продуктах может быть сведено к минимуму.

*Робота виконана в рамках проекту № 9-11 целевой комплексной программы научных исследований НАН Украины «Биомасса как топливное сырье» («Биотоплива»), а также при финансовой поддержке УНТЦ-5505.*

*K.V. Dmytruk, A.A. Sibirny*

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Lviv, Ukraine  
Rzeszow University, Poland  
E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

**METABOLIC ENGINEERING  
OF YEAST *HANSENULA POLYMORPHA*  
FOR CONSTRUCTION OF EFFICIENT  
ETHANOL PRODUCERS**

Until recently, the methylotrophic yeast was not considered as a potential producer of biofuels, particularly of ethanol from lignocellulosic hydrolysates. The first work published 10 years ago reveals the ability of thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to ferment xylose – one of the main sugars of lignocellulosic hydrolysates, which has made these yeast promising organism for high temperature alcoholic fermentation. Such feature of the *H. polymorpha* can be used in the implementation of potentially effective process of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of raw materials. SSF allows combining enzymatic hydrolysis of raw materials with the conversion of produced sugars into ethanol: enzymes hydrolyze polysaccharides to monomers, which are immediately consumed by microorganisms-producers of ethanol. However, the efficiency of alcoholic fermentation of major sugars realized after hydrolysis of lignocellulosic raw materials, and especially xylose, by wild strains of *H. polymorpha* requires significant improvement. In this review the main results of metabolic engineering of *H. polymorpha* for the construction of improved producers of ethanol from xylose, starch, xylan, and glycerol, as well as strains with increased tolerance to high temperature and ethanol are represented.

*K.V. Дмитрук, А.А. Сибірний*

**МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ДРІЖДЖІВ  
*HANSENULA POLYMORPHA* ДЛЯ СТВОРЕННЯ  
ЕФЕКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ ЕТАНОЛУ**

До недавнього часу ніхто не розглядав метило-трофні дріжджі як потенційний продуцент біо-палива, зокрема, біоетанолу з гідролізатів лігно-целюлози. Десять років тому було опубліковано пер-шу роботу, яка розкриває здатність термотолерант-них метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* зброджувати один з основних цукрів лігноцелю-

лози – ксилозу, що перетворило ці дріжджі на пер-спективний організм для проведення високо-температурної алкогольної ферментації. Така особ-ливість дріжджів *H. polymorpha* може бути ви-користана у потенційно ефективному процесі одно-часного оцукрювання та ферментації (ООФ) си-ровини. ООФ дозволяє поєднати ферментативний гідроліз сировини з конверсією утворених цукрів в етанол: ферменти гідролізують полісахариди до мономерних цукрів, які споживаються мікро-організмами – продуцентами етанолу. Однак ефек-тивність алкогольної ферментації дикими штам-ми *H. polymorpha* основних цукрів – продук-тів гідролізу лігноцелюлозної сировини, та особ-ливо ксилози, потребує істотного покращення. В представленому огляді викладено основні результа-ти в галузі метаболічної інженерії *H. polymorpha* для конструювання продуцентів етанолу з ксилози, крохмалю, ксилану та гліцерину, а також штамів з підвищеною толерантністю до високої температури та етанолу.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. *Ryabova O.B., Chmil O.M., Sibirny A.A.* Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *FEMS Yeast Res.* – 2003. – **3**. – P. 157–164.
2. *Schubert C.* Can biofuels finally take center stage? // *Nat. Biotechnol.* – 2006. – **24**, № 7. – P. 777–784.
3. *Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F. et al.* Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today // *Trends Biotechnol.* – 2006. – **24**, № 12. – P. 549–556.
4. *Hill J., Nelson E., Tilman D. et al.* Environmental, economic, and energetic costs and benefits of bio-diesel and ethanol biofuels // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**, № 30. – P. 11206–11210.
5. *Olofsson K., Bertilsson M., Lidén G.* A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks // *Bio-technol. Biofuels.* – 2008. – **1**, № 1. – P. 7.
6. *Abdel-Banat B.M., Hoshida H., Ano A. et al.* High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – **85**, № 4. – P. 861–867.
7. *Ishchuk O.P., Voronovsky A.Y., Abbas C.A., Sibirny A.A.* Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – **104**, № 5. – P. 911–919.
8. *Du Preez J.C., van der Walt J.P.* Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae* // *Biotechnol. Lett.* – 1983. – **5**. – P. 357–362.
9. *Toivola A., Yarrow D., van den Bosch E. et al.* Al-



- coholic fermentation of D-xylose by yeasts // Appl. Environ. Microbiol. – 1984. – **47**, № 6. – P. 1221–1223.
10. Du Preez J.C., Bosch M., Bernard A. Prior xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration // Enzyme and Microbial Technology. – 1986. – **8**, № 6. – P. 360–364.
  11. Jeffries T.W., Jin Y.-S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – **63**. – P. 495–509.
  12. Zeng Q.K., Du H.L., Wang J.F. et al. Reversal of coenzyme specificity and improvement of catalytic efficiency of *Pichia stipitis* xylose reductase by rational site-directed mutagenesis // Biotechnol. Lett. – 2009. – **31**, № 7. – P. 1025–1029.
  13. Matsushika A., Inoue H., Kodaki T., Sawayama S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – **84**, № 1. – P. 37–53.
  14. Brat D., Boles E., Wiedemann B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – **75**, № 8. – P. 2304–2311.
  15. Kuyper M., Hartog M.M., Toirkens M.J. et al. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation // FEMS Yeast Res. – 2005. – **5**. – P. 399–409.
  16. Jeffries T.W., Shi N.Q. Disruption of the cytochrome *c* gene in the xylose-fermenting yeast // United States Patent. – 2000. – № 6071729.
  17. Shi N.Q., Cruz J., Sherman F., Jeffries T.W. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipites* // Yeast. – 2002. – **19**, № 14. – P. 1203–1220.
  18. Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Fonseca C. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – **74**, № 5. – P. 937–953.
  19. Wisselink H.W., Toirkens M.J., Wu Q. et al. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – **75**, № 4. – P. 907–914.
  20. Grabek-Lejko D., Ryabova O.B., Oklejewicz B. et al. Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic fermentation // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – **33**, № 11. – P. 934–940.
  21. 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. – **23**. – P. 7–21.
  22. Dmytruk O.V., Voronovsky A.Y., Abbas C.A. et al. Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res. – 2008. – **8**. – P. 165–173.
  23. Voronovsky A.Y., Ryabova O.B., Verba O.V. et al. Expression of *xylA* genes encoding xylose isomerases from *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res. – 2005. – **5**. – P. 1055–1062.
  24. Pronk J.T., Yde Steensma H., Van Dijken J.P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. – 1996. – **12**, № 16. – P. 1607–1633.
  25. Schaaff I., Heinisch J., Zimmermann F.K. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast // Yeast. – 1989. – **5**, № 4. – P. 285–290.
  26. van Hoek P., Flikweert M.T., van der Aart Q.J. et al. Effects of pyruvate decarboxylase overproduction on flux distribution at the pyruvate branch point in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – **64**, № 6. – P. 2133–2140.
  27. Ischuk O.P., Voronovsky A.Y., Stasyk O.V. et al. Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature fermentation of xylose // FEMS Yeast Res. – 2008. – **8**, № 7. – P. 1164–1174.
  28. Suwannarangsee S., Oh D.B., Seo J.W. et al. Characterization of alcohol dehydrogenase 1 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – **88**, № 2. – P. 497–507.
  29. Denis C.L., Ferguson J., Young E.T. mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source // J. Biol. Chem. – 1983. – **258**. – P. 1165–1171.
  30. Lutstorf U., Megnet R. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Physiological control of *ADH-2* and properties of *ADH-2* and *ADH-4* // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – **126**. – P. 933–944.
  31. Cho J.-Y., Jeffries T.W. *Pichia stipitis* genes for alcohol dehydrogenase with fermentative and respiratory functions // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – **64**. – P. 1350–1358.
  32. Passoth V., Schäfer B., Liebel B. et al. Molecular cloning of alcohol dehydrogenase genes of the yeast *Pichia stipitis* and identification of the fermentative ADH // Yeast. – 1998. – **14**. – P. 1311–1325.

33. Reinders A., Romano I., Wiemken A., De Virgilio C. The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance // J. Bacteriol. – 1999. – **181**, № 15. – P. 4665–4668.
34. Kim J., Alizadeh P., Harding T. et al. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – **62**, № 5. – P. 1563–1569.
35. Londesborough J., Varimo K. Characterization of two trehalases in baker's yeast // Biochem. J. – 1984. – **219**, № 2. – P. 511–518.
36. Nwaka S., Mechler B., Holzer H. Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose // FEBS Lett. – 1996. – **386**, № 2/3. – P. 235–238.
37. Parrou J.L., Jules M., Beltran G., François J. Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function // FEMS Yeast Res. – 2005. – **5**, № 6/7. – P. 503–511.
38. Jung Y.J., Park H.D. Antisense-mediated inhibition of acid trehalase (*ATH1*) gene expression promotes ethanol fermentation and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* // Biotechnol. Lett. – 2005. – **27**, № 23/24. – P. 1855–1859.
39. Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter D., Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2005. – **12**, № 10. – P. 842–846.
40. Kitagawa M., Miyakawa M., Matsumura Y., Tsuchido T. *Escherichia coli* small heat shock proteins, IbpA and IbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants // Eur. J. Biochem. – 2002. – **269**, № 12. – P. 2907–2917.
41. Yoshida J., Tani T. Hsp16p is required for thermotolerance in nuclear mRNA export in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Cell Struct. Funct. – 2005. – **29**, № 5/6. – P. 125–138.
42. Haslbeck M., Braun N., Stromer T. et al. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae* // EMBO J. – 2004. – **23**, № 3. – P. 638–649.
43. Cashikar A.G., Duennwald M., Lindquist S.L. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104 // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, № 25. – P. 23869–23875.
44. Weibezahn J., Tessarz P., Schlieker C. et al. Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB // Cell. – 2004. – **119**, № 5. – P. 653–665.
45. Lindquist S., Kim G. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1996. – **93**, № 11. – P. 5301–5306.
46. Parsell D.A., Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins // Ann. Rev. Genet. – 1993. – **27**. – P. 437–496.
47. Guerra E., Chye P.P., Berardi E., Piper P.W. Hypoxia abolishes transience of the heat-shock response in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Microbiology. – 2005. – **151**, № 3. – P. 805–811.
48. Pugh D.J., Ab E., Faro A. et al. DWN1, a novel ubiquitin-like domain, implicates RBBP6 in mRNA processing and ubiquitin-like pathways // BMC Struct. Biol. – 2006. – **5**. – P. 6:1.
49. Weissman A.M. Themes and variations on ubiquitylation // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2001. – **2**, № 3. – P. 169–178.
50. Passmore L.A., Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation // Biochem. J. – 2004. – **379**, № 3. – P. 513–525.
51. Cardona F., Aranda A., del Olmo M. Ubiquitin ligase Rsp5p is involved in the gene expression changes during nutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. – 2009. – **26**, № 1. – P. 1–15.
52. Costa V., Amorim M.A., Reis E. et al. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase // Microbiology. – 1997. – **143**, № 5. – P. 1649–1656.
53. Nomura M., Takagi H. Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**, № 34. – P. 12616–12621.
54. Kadam K.L., Schmidt S.L. Evaluation of *Candida acidothromophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1997. – **48**. – P. 709–713.
55. Fujita Y., Ito J. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – **70**. – P. 1207–1212.
56. Gaspar M., Kalman G., Reczey K. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production // Process. Biochem. – 2007. – **42**. – P. 1135–1139.
57. Eksteen J.M., van Rensburg P., Cordero Otero R.R., Pretorius I.S. Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the  $\alpha$ -amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera* // Biotechnol. Bioeng. – 2003. – **84**. – P. 639–646.
58. Piontek M., Hagedorn J., Hollenberg C.P. et al. Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis* //

- Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – 5. – P. 331–338.
59. Shigechi H., Koh J., Fujita Y. et al. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70. – P. 5037–5040.
60. Wang T.T., Lin L.L., Hsu W.H. Cloning and expression of a *Schwanniomyces occidentalis*  $\alpha$ -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – 55. – P. 3167–3172.
61. Gellissen G., Janowicz Z.A., Merckelbach A. et al. Heterologous gene expression in *Hansenula polymorpha*: Efficient secretion of glucoamylase // Bio. Technology. – 1991. – 9. – P. 291–295.
62. Voronovsky A.Y., Rohulya O.V., Abbas C.A., Sibirny A.A. Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan // Metab. Eng. – 2009. – 11, № 4/5. – P. 234–242.
63. Torronen A., Mach L.R., Massner R. et al. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes // Biotechnology. – 1992. – 10. – P. 1461–1465.
64. La Grange D.C., Pretorius I.S., van Zyl W.H. Expression of a *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylanase gene (*XYN2*) in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – 62. – P. 1036–1044.
65. Katahira S., Fujita Y., Mizuike A. et al. Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70. – P. 5407–5414.
66. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification // J. Biol. Chem. – 1988. – 263, № 33. – P. 17205–17208.
67. Alexandre H., Ansanay-Galeote V., Dequin S., Blondin B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett. – 2001. – 498. – P. 98–103.
68. Ubiyvovk V.M., Nazarko T.Y., Stasyk O.G. et al. *GSH2*, a gene encoding gamma-glutamylcysteine synthetase in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res. – 2002. – 2. – P. 327–332.
69. Ubiyvovk V.M., Ananin V.M., Malyshev A.Y. et al. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1 BMC // Biotechnol. – 2011. – 11, № 1. – P. 8.
70. Grabek-Lejko D., Kurylenko O.O., Sibirny V.A. et al. Alcoholic fermentation by wild-type *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* versus recombinant strains with an elevated level of intracellular glutathione // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2011 [Epub ahead of print].
71. Kiel J.A., Rechinger K.B., van der Klei I.J. et al. The *Hansenula polymorpha* *PDD1* gene product, essential for the selective degradation of peroxisomes, is a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Vps34p // Yeast. – 1999. – 15, № 9. – P. 741–754.

Поступила 27.10.11