

УДК 576.343:582.282.23

О.В. ДМИТРУК¹, К.В. ДМИТРУК¹,
А.Я. ВОРОНОВСЬКИЙ¹, А.А. СИБІРНИЙ^{1,2}

¹ Інститут біології клітини НАН України, Львів 79005

² Жешівський університет, Жешів 35–601, Польща

E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ПОЧАТКОВИХ ЕТАПІВ КАТАБОЛІЗМУ КСИЛОЗИ У ДРІЖДЖІВ З МЕТОЮ КОНСТРУЮВАННЯ ЕФЕКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ ЕТАНОЛУ З ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗИ



*Рослинна біомаса має величезний потенціал як сировина для виробництва біопалива, зокрема паливного етанолу. Основними складовими рослинної біомаси є глюкоза та п'ятивуглецевий цукор ксилоза. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, які використовуються для промислового виробництва етанолу з глюкози та сахарози, не здатні ферментувати ксилозу. Отже, аби забезпечити економічно вигідне перетворення рослинної біомаси до етанолу, потрібно знайти у природі або сконструювати мікроорганізм, здатний до підвищеної ферментації не лише глюкози, а і ксилози. Досягти активної ферментації ксилози можна, забезпечивши ефективність початкових етапів метаболізму цієї пентози, які визначають і ефективність алкогольної ферментації ксилози в цілому [1]. В огляді детально охарактеризовані ферменти, задіяні на початкових етапах метаболізму ксилози у дріжджів (ксилоредуктаза, ксилітолдегідрогеназа і ксилулокіназа) і бактерій (ксилізоізомераза і ксилулокіназа), та показані шляхи конструювання штамів дріжджів, здатних до ефективного синтезу етанолу із ксилози.*

© О.В. ДМИТРУК, К.В. ДМИТРУК, А.Я. ВОРОНОВСЬКИЙ,
А.А. СИБІРНИЙ, 2008

Вступ

На сьогодні понад три чверті виробленого в світі етанолу використовується як додаток до палива в двигунах внутрішнього згоряння і лише 15 % – для приготування спиртних напоїв. Однак джерелами паливного етанолу служать досить дорогі субстрати – цукор (сахароза) або крохмаль, що перешкоджає широкому розповсюдженню виробництва паливного етанолу. Водночас етанол у величезних кількостях можна одержувати з відходів сільського господарства та деревообробної промисловості (солома, кукурудзяний качан, лузга насіння, кора дерев тощо), що дозволило б істотно зменшити забруднення навколишнього середовища такими відходами. Спалювання поновлюваного джерела енергії – рослинної біомаси або продуктів її ферментації, на відміну від спалювання викопного палива, не призводить до зростання кількості вуглекислого газу, що надходить до атмосфери, оскільки ці сполуки в будь-якому випадку перетворюватимуться до вуглекислоти внаслідок мікробної деградації (процес так званої мінералізації біомаси, який забезпечує кругообіг вуглецю в природі). Безпосереднє спалювання біомаси в двигунах внутрішнього згоряння бензинових автомобілів неможливе, однак у випадку перетворення біомаси до етилового спирту замість бензину можна використовувати бензино-етанольні суміші або чистий етанол. Наявність в бензині кисневмісної сполуки, етанолу, дозволяє досягти практично повного окислення в двигунах чадного газу до вуглекислого, а закису і окису азоту до двоокису азоту, що суттєво зменшує токсичність вихлопних газів. В багатьох країнах світу, зокрема в Бразилії, США, Канаді та країнах Європейського співтовариства, існують національні програми виробництва паливного етанолу з конвенційної сировини (цукор, крохмаль) та національні і міжнародні програми наукових досліджень, спрямовані на розробку технологій отримання паливного етанолу з лігноцелюлозних відходів сільського господарства та деревообробної промисловості.

Алкогольна ферментація конвенційної сировини – гексоз, їх димерів (сахароза, мальтоза, целобіоза) або полімерів (целюлоза, амілоза, амілопектин) ефективно здійснюється за допомогою мікроорганізмів. Для цієї процедури традиційно використовують дріжджі *Saccharo-*

myces cerevisiae або бактерії *Zygomonas mobilis*. Однак серед основних цукрів лігноцелюлозних гідролізатів, окрім гексоз, значний відсоток (35–45 %) складають пентози (ксилоза, арабіноза), які не ферментують і не метаболізують сахароміцети або *Z. mobilis*.

Слід зазначити, що ферментувати пентози здатна досить обмежена група мікробів, серед яких найбільший інтерес викликають дріжджі *Pichia stipitis*. Однак хоча рівень алкогольної ферментації ксилози *P. stipitis* наближається до теоретично можливого максимуму, алкогольна ферментація гексоз у цього організму значно поступається ефективності даного процесу у сахароміцетів. Для максимальної реалізації енергетичного потенціалу лігноцелюлози необхідно використовувати штами, здатні до активного спиртового бродіння як гексоз, так і пентоз. Оскільки таких штамів у природі поки що не виявлено, проводиться пошук у природі мікроорганізмів – ефективних ферментаторів основних цукрів гідролізатів лігноцелюлози, з одного боку, та конструювання рекомбінантних штамів шляхом введенням генів пентозного метаболізму у геном традиційних ферментуючих організмів (*S. cerevisiae*, *Z. mobilis*) – з іншого.

У даному огляді основну увагу зосереджено на особливостях початкових етапів метаболізму ксилози у дріжджів, які є лімітуючими на шляху ефективної алкогольної ферментації лігноцелюлозних гідролізатів.

Метаболізм ксилози у дріжджів

П'ятивуглецевий цукор ксилоза є одним з основних компонентів лігноцелюлозних гідролізатів. Її усереднена кількість досягає 30 % загального вмісту цукрів у гідролізатах. У ксилозоферментуючих дріжджів на перших етапах метаболізму цієї пентози задіяні два ферменти, що належать до класу оксидоредуктаз: НАДФН-залежна ксилоредуктаза (КР) (ЕС 1.1.1.21.) і НАД-залежна ксилітолдегідрогеназа (КДГ) (ЕС 1.1.1.9.). Початковим етапом метаболізму є відновлення ксилози до ксиліту за допомогою ферменту КР з наступним окисненням ксиліту до ксилулози за допомогою КДГ. Далі ксилулоза фосфорилується ксилулокіназою (КК) (ЕС 2.7.1.17) до ксилулозо-5-фосфату, який поступає в пентозофосфатний шлях

(ПФШ) з наступним перетворенням у гліколітичному шляху до пірувату. На завершальному етапі піруват перетворюється в ацетальдегід, який відновлюється до етанолу (рис. 1).

Транспорт ксилози

Першим етапом метаболізму ксилози у дріжджів є її транспорт в клітину. Відомо, що у ксилозозасвоюючих дріжджів *P. stipitis*, *Pichia heedii* і *Candida shehatae* ксилоза потрапляє в клітину за допомогою двох транспортних систем в залежності від концентрації цукру в середовищі. При високій концентрації ксилози спрацьовує низькоспоріднена транспортна система або так звана система полегшеної дифузії за градієнтом концентрації цукру. При низькій концентрації ксилози в середовищі клітина використовує високоспоріднену транспортну систему з використанням АТФ (ксилозо-протонна симпортна система) [2, 3]. Встановлено, що гени *SUT1 P. stipitis* (цукровий транспортер 1) і *GXF1 Candida intermedia* (глюкозо-ксилозний фасилітатор 1) кодують глюкозо-ксилозні транспортери, які експресуються конститутивно та забезпечують низькоспоріднений транспорт ксилози у клітину [4, 5]. Високоспоріднена симпортна система поки що ідентифікована лише в *C. intermedia*. Ген *GXS1* (глюкозо-ксилозний симпортер 1) кодує транспортер, що належить до родини моносахарид-протонних симпортерів, які присутні у деяких дріжджів і грибів, проте не виявлені у *S. cerevisiae* [4]. Гомологи генів *GXF1* та *GXS1 C. intermedia* були ідентифіковані в геномі термотолерантних ксилозозасвоюючих дріжджів *Hansenula polymorpha*. Однак посилення експресії потенційних транспортерів ксилози не призводило до покращання ефективності алкогольної ферментації ксилози.

У *S. cerevisiae* ксилоза потрапляє в клітину через гексозні транспортери, які мають в декілька разів нижчу спорідненість до ксилози порівняно з глюкозою [6, 7]. Гексозні транспортери належать до родини генів *HXT* [8]. У *S. cerevisiae* виявлено високоспоріднені (*HXT2*, *HXT6* і *HXT7*) і низькоспоріднені (*HXT1*, *HXT3* і *HXT4*) транспортери гексоз [9]. Високоспоріднена система ($K_{M \text{ глюкоза}} = 1,5 \text{ мМ}$) репресується глюкозою, а низькоспоріднена система ($K_{M \text{ глюкоза}} = 20\text{--}35 \text{ мМ}$) є конститутив-

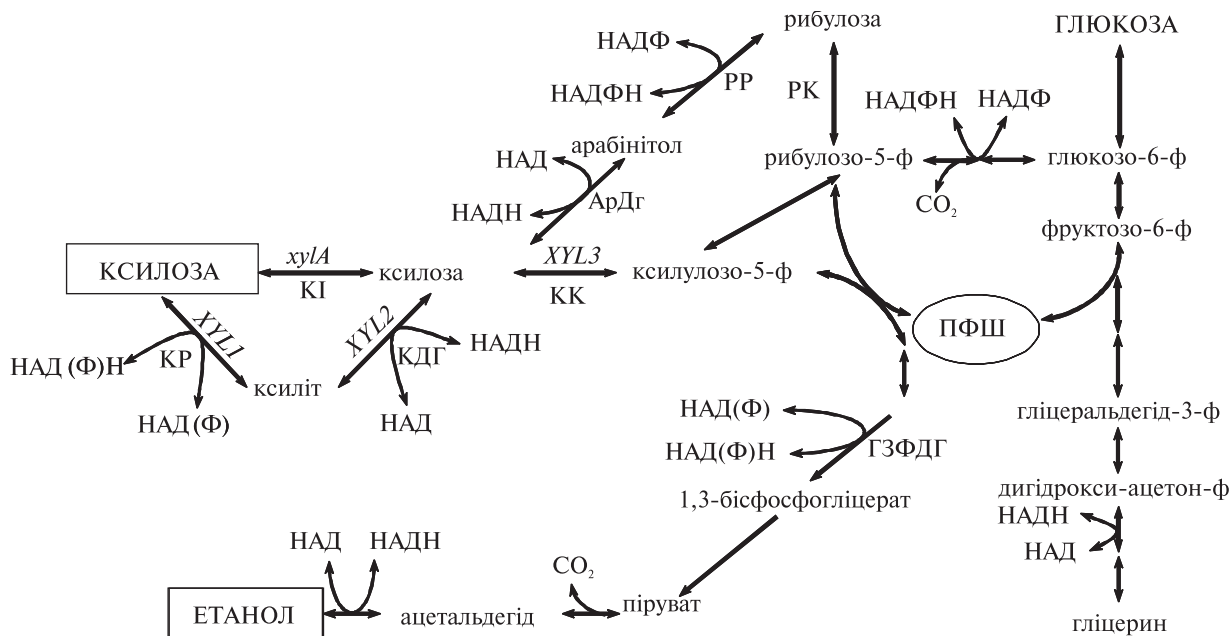


Рис. 1. Шлях метаболізму ксилози у дріжджів та бактерій: КР – ксилозоредуктаза, КДГ – ксилітолдегідрогеназа, КІ – ксилозоізомераза, КК – ксилулокіназа, АрДГ – арабінітолдегідрогеназа, РР – рибулозоредуктаза, РК – рибулокіназа, ГЗФДГ – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа

ною [10, 11]. K_m ксилози для високоспорідних Hxt-транспортерів становить приблизно 137–190 мМ, а низькоспорідних приблизно 1,5 М. Це призводить до того, що в глюкозо-ксилозних сумішах спочатку утилізується глюкоза, а потім ксилоза [7, 12].

Для дослідження ролі гексозних транспортерів у транспорті ксилози було сконструйовано рекомбінантний штам *S. cerevisiae* ТМВ3201 з делеціями 18 генів *HXT*. Створений штам втрачав здатність рости на середовищі з ксилозою [13, 14]. Шляхом експресії кожного з генів *HXT* в делеційному штамі було встановлено, що глюкозні транспортери Hxt7, Gal2, Hxt4 та Hxt5 є необхідними для транспорту ксилози [13]. Також було показано, що при рості на середовищі з ксилозою як єдиним джерелом вуглецю у *S. cerevisiae* експресуються лише Hxt5 і Hxt7. Результати обох експериментів чітко корелюють та вказують на те, що саме ці два Hxt-білки є необхідними для транспорту ксилози [15, 13]. При коферментації ксилози і глюкози спостерігалось також підвищення рівня експресії гена *AGT1*. Ген *AGT1*, що кодує високоспорідний сахарозо-протонний симпортер, є необхідним для транспорту сахарози

у клітину *S. cerevisiae*, проте раніше ніколи не асоціювався з транспортом ксилози [16]. За умов надекспресії ключових ксилозних транспортерів *HXT7* і *GAL2* покращання утилізації ксилози у промислового ферментатора ксилози штама ТМВ3001 не спостерігалось [13]. Очевидно, забезпечення ефективного транспорту ксилози в клітину є комплексною проблемою, що вимагає подальших досліджень не лише рівня експресії тих чи інших транспортерів, але й їх регуляції.

Дисбаланс кофакторів при алкогольній ферментації ксилози у дріжджів та шляхи його подолання

Існує фундаментальне розмежування між системами НАДФ/НАДФН і НАД/НАДН у більшості біохімічних шляхів. Катаболічні реакції переважно пов'язані з системою НАД/НАДН, а анаболічні – з системою НАДФ/НАДФН. Однак в метаболізмі ксилози у дріжджів обидві кофакторні пари є необхідними для катаболічних реакцій. Оскільки КР і КДГ мають різну кофакторну специфічність, КР використовує переважно НАДФН, а КДГ – НАД, то це призводить до накопичення НАДФ

та НАДН і, як результат, до створення дисбалансу кофакторів у клітині. Для відновлення балансу кофактори повинні бути регенеровані. НАДФН у більшості регенерується в окислювальній частині пентозофосфатного шляху. При цьому 1 М глюкозо-6-фосфата, який походить від фруктозо-6-фосфата, окислюється за допомогою глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і 6-фосфоглюконатдегідрогенази з утворенням 2 М НАДФН і 1 М CO_2 (рис. 1). Активності цих ферментів окислювальної частини пентозофосфатного шляху підвищуються під час росту дріжджів на середовищі з пентозами, які є джерелом вуглецю [17]. Для покращання виходу етанолу важливо регенерувати НАДФН шляхом, який не пов'язаний з продукцією CO_2 і тому не призводить до небажаного відтоку вуглецю. У рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*, які містили гени перших етапів метаболізму ксилози, було експресовано ген *GDPI*, що кодує НАДФ-залежну гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу із *Kluyveromyces lactis*, яка здійснює регенерацію НАДФН, не пов'язану з продукцією CO_2 , на відміну від НАДФ-залежної декарбоксилуючої 6-фосфоглюконатдегідрогенази (рис. 1). Рівень ферментації ксилози до етанолу отриманими рекомбінантними штамми був підвищеним порівняно із вихідним штамом, при цьому рівень формування CO_2 був пониженим. Додаткова делеція гена *ZWF1*, що кодує глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, в поєднанні з надекспресією гена *GDPI* істотно стимулювала ферментацію ксилози до етанолу [18]. В аеробних умовах НАДН окислюється у дихальному ланцюгу, а акцептором електронів служить молекулярний кисень. Проте за анаеробних умов необхідна наявність інших акцепторів, якими можуть бути ацетон [19], фурфурол [20] та інші сполуки. Якщо ж такі акцептори відсутні, клітини не спроможні відновити кофакторний баланс і таким чином не здатні ферментувати ксилозу до етанолу за анаеробних умов. Як було зазначено вище, за умов анаеробного росту в середовищі з ксилозою за участю НАД-залежної КДГ відбувається формування значної кількості НАДН. Один з шляхів відновлення балансу кофакторів полягає в окисненні надлишкового НАДН до НАД за участю гліцерол-фосфатдегідрогенази з утворенням побічного продукту – гліцерину [21] (рис. 1).

Іншим шляхом усунення дисбалансу кофакторів є перенесення водню між двома нуклеотидними системами НАДН/НАД та НАДФН/НАДФ за допомогою ферменту трансгідрогенази: $\text{НАДН} + \text{НАДФ} \rightarrow \text{НАД} + \text{НАДФН}$. Цей фермент зустрічається у багатьох організмів, проте у дріжджів його не виявлено [22, 23]. Показано, що експресія гетерологічної прокариотної трансгідрогенази у *S. cerevisiae* призводить до зменшення утворення НАДФН, однак при цьому значно підвищується кількість гліцерину і 2-оксоглутарату, а вихід біомаси і етанолу істотно знижується. Оскільки НАДФН використовується для перетворення 2-оксоглутарату в глутамат, а кількість гліцерину підвищується при надлишку НАДН, це свідчить про недостатню трансгідрогеназну активність та неефективне перетворення НАДН і НАДФ в НАД і НАДФН [24].

Анаеробна алкогольна ферментація ксилози без нагромадження побічних продуктів стає можливою лише за умов однакової кофакторної специфічності КР і КДГ або наявності іншого ферменту, що здатний безпосередньо перетворювати ксилозу в ксилулозу, оминаючи етап формування ксиліту. Таким ферментом є ксилозоізомераза (КІ) (ЕС 5.3.1.5), що зустрічається у бактерій та грибів [21]. Її особливості та застосування будуть описані нижче.

Ксилоредуктаза

КР каталізує НАДФН-залежне відновлення ксилози до ксиліту. Активність КР є необхідною для росту дріжджів на ксилозі. Дріжджові КР належать до ферментної родини альдо-кеторедуктаз, яка широко представлена серед багатьох організмів, включаючи ссавців, риб, комах, амфібій і рептилій [25]. Перша дріжджова КР була клонована у *P. stipitis* в 1991 р. [26, 27], згодом були клоновані КР *Candida tropicalis* [28], *K. lactis* [29], *Pachysolen tannophilus* [30], *Candida tenuis* [31], *Candida parapsilopsis* [32]. Делеція гена *XYL1*, що кодує КР, у дріжджів призводить до втрати здатності рости на середовищі з ксилозою [33]. Хоча більшість відомих альдо-кеторедуктаз є мономерами, КР дріжджів – це димери з молекулярною масою субодиниць від 33 до 40 кДа.

Для функціонування даного ферменту необхідна наявність кофакторів. Наприклад, не-

Специфічність кофакторів КР різних видів дріжджів

Мікроорганізм	Кофактор для КР
<i>S. cerevisiae</i> (альдозоредуктаза)	НАДФН
<i>C. utilis</i>	НАДФН
<i>P. stipitis</i>	НАДФН/НАДН
<i>C. tenuis</i>	НАДФН/НАДН
<i>C. parapsilosis</i>	НАДН
<i>P. tannophilus</i>	
1-й ізоцим	НАДФН/НАДН
2-й ізоцим	НАДФН

специфічна альдозоредуктаза *S. cerevisiae*, яка виявляє активність КР [34], як і КР із *C. utilis* [23], використовує як кофактор лише НАДФН, натомість КР *P. stipitis* [35] і *C. tenuis* [31], крім НАДФН, також здатні використовувати НАДН. КР *C. parapsilosis* має значно вищу спорідненість до НАДН порівняно з НАДФН [32]. *P. tannophilus* синтезує два ізоферменти КР, один з яких може використовувати як НАДН, так і НАДФН, а другий лише НАДФН [35] (таблиця). При зниженій аерації фермент переважно використовує обидва кофактори [36]. Більше 200 видів дріжджів здатні рости на ксилізі і лише деякі здатні ферментувати її до етанолу. Існує чітка кореляція між здатністю КР використовувати обидва кофактори (НАДН і НАДФН) і здатністю дріжджів до алкогольної ферментації ксиліози.

КР *S. cerevisiae* була охарактеризована Kuhn et al. [34] в 1995 р. Очищений мономерний фермент з молекулярною масою 37 кДа виявляв залежність від НАДФН. КР мала значно вищу спорідненість до ароматичних або аліфатичних альдегідів, ніж до альдозо-цукрів, найкращим субстратом для КР був нітробензальдегід ($K_m = 46$ мкМ), афінність ферменту до ксиліози становить 14,8–27,9 мМ [37]. Послідовність гена *GRE3 S. cerevisiae*, що кодує КР, виявляє високу ступінь гомології (72 %) до гена *XYL1 P. stipitis* [34]. Відомо, що ген *GRE3* індукується в стресових умовах, таких як осмотичний та оксидативний стрес, підвищення температури культивування і нестача вуглецю [38]. За деяких умов делеція гена *GRE3* призводить до зменшення нагромадження ксиліту [39]. Два інших гомологи НАДФН-залежної альдозоредуктази у *S. cere-*

visiae, *YPR1* і *YJR096w*, також здатні використовувати ксилізу як субстрат, проте ці ферменти мають набагато вищу K_m для ксиліози порівняно з *Gre3p* [40].

Ксилітолдегідрогеназа

КДГ кодується геном *XYL2* та каталізує перетворення ксиліту в ксилулозу із використанням НАД як кофактора. Гени *XYL2* було клоновано у деяких видів дріжджів і грибів, серед яких *P. stipitis*, *S. cerevisiae*, *Hypocrea jecorina*, *Aspergillus oryzae*, *Arxular adenivorans*, *Galactocandida mastodermitis* і *C. tropicalis* [41–46].

В геномі *S. cerevisiae* є три гени з високою гомологією до гена *XYL2 P. stipitis*. Відкрита рамка зчитування *YLR070c (ScXYL2)* кодує фермент КДГ [41]. Показано, що для цього ферменту K_m ксиліт = 25 мМ, K_m НАД = 240 мкМ, K_m ксилулоза = 1,1 мМ, K_m НАДН = 55 мкМ [41]. Ці кінетичні параметри вказують на те, що фермент надає перевагу зворотній реакції перетворення ксилулози у ксиліт і, швидше всього, не здатен забезпечувати потрібний високий рівень перетворення ксиліози до етанолу по метаболічному шляху. Цікавим є те, що в адаптованого до алкогольної ферментації ксиліози штама *S. cerevisiae* MBG-2303 активність КДГ є підвищеною у 80 разів порівняно з вихідним штамом [47].

Двома іншими паралогами КДГ є *SOR1*, що кодує сорбітолдегідрогеназу, яка здатна використовувати ксиліт як субстрат, та ген *YDL246c*, що виявляє високий ступінь гомології до *SOR1* [48].

НАД-залежна КДГ *P. stipitis* має подібні кінетичні константи (K_m ксиліт = 26 мМ, K_m НАД = 160 мкМ) до КДГ *S. cerevisiae*. Вважають, що КДГ *P. stipitis* регулюється співвідношенням НАДН/(НАДН+НАД) у клітині [49]. Таким чином, при сповільненій аерації внутрішньоклітинна концентрація НАДН збільшується, що призводить до зниження активності КДГ та формування більшої кількості ксиліту.

Делеція гена *XYL2* у ксилітозасвоюючих дріжджів призводить до втрати здатності використовувати ксиліт як джерело вуглецю [33, 50]. Разом з тим деякі види дріжджів з делецією гена *XYL2* використовуються для продукції ксиліту, адже цей поліалкоголь далі не метаболізується та викидається клітиною у середовище [51].

Білкова інженерія ксилоредуктази і ксилітолдегідрогенази

Дріжджі *S. cerevisiae* є найкращими ферментаторами глюкози, але зовсім не здатні ферментувати ксилозу. Відомо також, що штами дикого типу *S. cerevisiae* метаболізують ксилозу вкрай неефективно і лише за певних умов [21, 38, 47], оскільки ендogenousні КР і КДГ не розпізнають ксилозу як субстрат. На противагу конвенційним дріжджам, *P. stipitis* є найкращим відомим ксилороутілізуючим мікроорганізмом. Було створено рекомбінантні штами *S. cerevisiae*, які містили гени *XYL1* і *XYL2 P. stipitis*, що кодуєть КР і КДГ відповідно. Вибір *P. stipitis* як донорного організму базувався на здатності КР використовувати НАДН як кофактор. Проте рекомбінантні штами *S. cerevisiae*, які містили КР і КДГ, забезпечували низьку продукцію етанолу і характеризувалися значним накопиченням ксиліту [52].

Формування ксиліту зменшується, якщо рециркуляція НАДН-НАД відбувається в одному ферменті, де НАДН окислюється в домені КР, а утворений НАД використовується в домені КДГ. Було створено серію КР/КДГ-гібридних білків. Для збереження обох активностей КР і КДГ важливою є локалізація доменів, КДГ – на N-кінці, а КР – на C-кінці гібридного білка. Важливе значення має також довжина і структура зв'язуючого пептида [53]. Створений гібридний білок виявляв лише 10 % активностей КР і КДГ порівняно з двома ферментами, які експресувалися окремо. При коекспресії гібридного білка та нативних КР і КДГ сумарна активність ферментів відповідала активності вихідного штаму, а накопичення ксиліту при цьому істотно зменшувалось [53].

Були здійснені спроби змінити кофакторну специфічність КР і КДГ. Для цього були використані методи білкової інженерії. [54]. Дріжджова КР містить консервативний НАДФН-зв'язуючий домен – Lys²⁷⁰– Ser²⁷¹– Asn²⁷²– Thr²⁷³. За допомогою сайт-специфічного мутагенезу було показано, що у *P. stipitis* лізин-270, який знаходиться в консервативному домені КР, безпосередньо бере участь у зв'язуванні ксилози і НАДФН. У випадку заміни лізину на метіонін спостерігалось істотне зменшення спорідненості КР до НАДФН і незначна зміна спорідненості до НАДН. Лізин-270 зв'язуєть-

ся з 2'-фосфатною групою НАДФН, адже єдиною відмінністю між цими двома кофакторами є наявність фосфатної групи у НАДФН [55]. У рекомбінантного штаму *S. cerevisiae*, який містив КДГ *P. stipitis* та посилену ендogenousну КК, було експресовано мутантну форму КР *P. stipitis*, що мала підвищену спорідненість до НАДН [55]. Такий штам характеризувався підвищеним виходом етанолу з ксилози і зниженою кількістю ксиліту. Додатковий аналіз показав, що рекомбінантний штам засвоює більшу кількість НАДН порівняно зі штамом, що містить нативну КР. Штами з додатковою копією модифікованої КР за рівнем алкогольної ферментації ксилози не відрізнялись [56].

Для подальшого підвищення спорідненості КР до НАДН проводили заміни амінокислот у межах консервативного кофакторзв'язуючого домену. Було створено модифіковані ферменти з наступними модифікаціями:

1) лізин в положенні 270 замінено на аргінін (K270-R); така мутантна КР мала знижену спорідненість до НАДФН, проте спорідненість до НАДН залишалася незмінною порівняно з КР дикого типу;

2) лізин в положенні 270 замінено на гліцин (K270-G), активність мутантної КР істотно знижувалась при використанні як НАДН, так і НАДФН, можливо така мутація призводила до втрати структурної стабільності ферменту;

3) серин в положенні 271 замінено на аланін, в такій КР вищою була спорідненість до НАДФН;

4) аспарагін в положенні 272 замінено на аспарагінову кислоту; спорідненість до НАДФН була вищою, ніж спорідненість до НАДН;

5) триптофан в положенні 273 замінено на серин; у мутантної КР істотно знижувалась загальна активність ферменту, по аналогії з мутацією K270-G.

Було отримано рекомбінантні штами *S. cerevisiae*, які експресували модифіковану КР K270-R і нативну КДГ *P. stipitis*. Сконструйовані штами характеризувалися зменшенням накопичення ксиліту порівняно зі штамом, що містив нативну КР *P. stipitis*, проте вихід етанолу залишався на рівні вихідного штаму [57].

У нашій лабораторії за допомогою методу сайт-специфічного мутагенезу було сконструйовано модифіковану форму КР *H. polymor-*

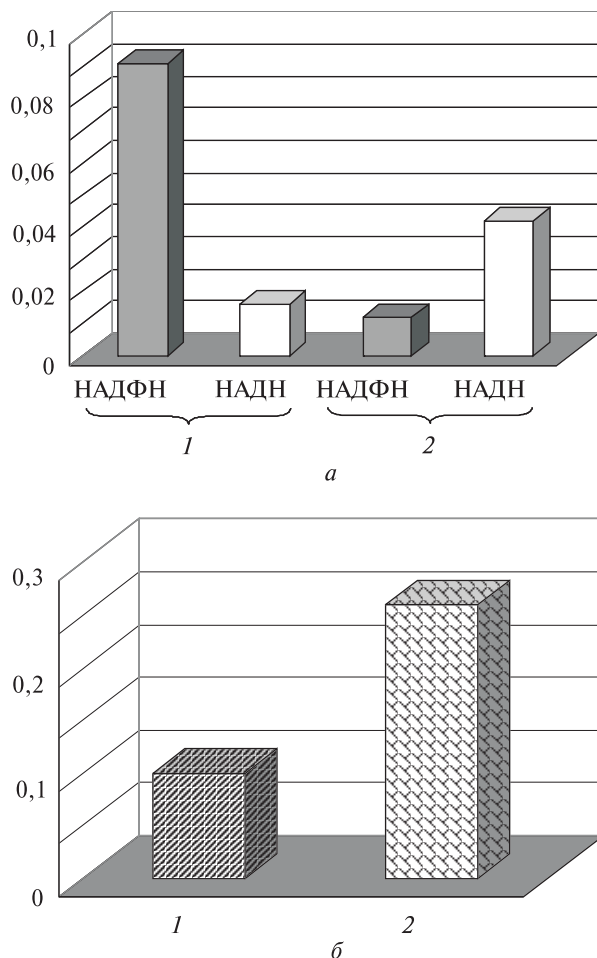


Рис. 2. Активність КР (по вертикалі, МО/мг білка) при використанні різних кофакторів (НАДФН і НАДН) у штамі *H. polymorpha* (а) та вихід етанолу (по вертикалі, г/л) при ферментації ксилози штамами *H. polymorpha* (б): 1 – вихідний штам CBS4732 leu2; 2 – штам, що містить модифіковану КР

pha. Для цього лізин в положенні 341 було замінено на аргінін, а аспарагін в положенні 343 було замінено на аспарагінову кислоту. Було отримано рекомбінантні штами, в яких ендогенний ген було замінено на ген, що кодує модифіковану або нативну КР, під контролем сильного конститутивного промотора гена, що кодує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу. Було показано, що спорідненість модифікованої КР до НАДН є вищою, ніж в нативної КР. Рівень ферментації ксилози до етанолу у штамі, що містили модифіковану КР, також підвищився. Отже, часткове усунення дисбалансу

нікотинамідних кофакторів забезпечує підвищення виходу етанолу (рис. 2).

Було показано, що КР *S. parapsilosis* володіє спорідненістю до НАДН в 100 разів вищою порівняно з НАДФН. Ген *XYL1* *S. parapsilosis* було клоновано і експресовано в *S. tropicalis*. Отримані рекомбінантні штами характеризувалися підвищеним рівнем продукції етанолу із ксилози [32].

Було здійснено спроби змінити кофакторну специфічність КДГ з НАД на НАДФ. Однак стеричні властивості залишку аспартату коензимзв'язуючого домену і відштовхування між негативно зарядженими групами фосфату НАДФ і карбоксильною групою аспартату перешкождали зв'язуванню НАДФ. Стеричні та електростатичні перешкоди були ліквідовані заміною аспартату на гліцин. Спостерігалось зменшення спорідненості КДГ до НАД, однак появи спорідненості ферменту до НАДФ досягти не вдалось. До того ж специфічна активність модифікованої КДГ зменшувалась у два рази порівняно з нативним ферментом [58]. Кофакторзв'язуючий домен НАДФ-залежної алкогольдегідрогенази із *Thermoanaerobium brockii* було перенесено у КДГ *P. stipitis*. Утворений гібридний фермент виявляв 31 % специфічної активності, спорідненість до НАДФ зменшувалась у 9 разів, спорідненість до НАД залишилася незмінною. Модифікований фермент було коекспресовано в *S. cerevisiae* разом з КР *P. stipitis*. Отримані рекомбінантні штами *S. cerevisiae* виявляли здатність до росту в середовищі з ксилозою [58].

Watanabe et al. [59], використовуючи метод сайт-специфічного мутагенезу, проводили дослідження функцій амінокислотних залишків Asp²⁰⁷, Pe²⁰⁸, Phe²⁰⁹ і Asn²¹¹ при зв'язуванні КДГ *P. stipitis* НАД або НАДФ. Заміна однієї амінокислоти у складі КДГ, зокрема аспарагінової кислоти в положенні 207 на аланін (D207-A), ізолейцину в положенні 208 на аргінін (I208-R), фенілаланіну в положенні 209 на серин (F209-S) або аспарагіну в положенні 211 на аргінін (N211-R), виявлялася у 5–48-кратному підвищенні каталітичної активності ферменту при використанні НАДФ порівняно з нативною КДГ. Водночас модифіковані форми КДГ зберігали достатньо високу активність з НАД. Мутантні форми ферменту з подвійними замі-

нами (D207-A/I208-R і D207-A/F209-S) характеризувалися подібними ознаками. Мутантні форми КДГ з трьома (D207-A/I208-R/F209-S) та чотирма замінами (D207-A/I208-R/F209-S/N211-R) характеризувалися 4500-кратним підвищенням каталітичної активності ферменту при використанні НАДФ порівняно з використанням НАД КДГ дикого типу. Однак термостабільність більшості НАДФ-залежних мутантів КДГ істотно поступалась ферменту дикого типу. Для підвищення термостабільності в модифіковану КДГ було введено додаткові атоми цинку. Окрім стабілізації білка, це призвело і до додаткового підвищення каталітичної активності ферменту при використанні НАДФ [59]. Рекombінантні *S. cerevisiae*, які містили нативну КР *P. stipitis* і різні типи модифікованих НАДФ-залежних КДГ [59], характеризувалися підвищенням продукції етанолу із ксилози до 41 % та зменшенням утворення побічного продукту ксиліту [60].

Експресія ксилозоредуктази і ксилітолдегідрогенази у *S. cerevisiae*

В *S. cerevisiae* досліджували ендogenousний шлях метаболізму ксилози. Було показано, що надекспресія власних генів *GRE3* і *XYL2* забезпечує здатність *S. cerevisiae* рости на середовищі з ксилозою в присутності глюкози за аеробних умов. Проте, порівняно зі штамми *S. cerevisiae*, які експресують гени *XYL1* і *XYL2 P. stipitis*, штамми з ендogenousними генами ростуть на ксилосі значно повільніше і акумулюють більшу кількість ксиліту. Різницю у швидкості росту пов'язують зі строгою специфічністю КР до НАДФН на відміну від КР *P. stipitis*, яка виявляє подвійну специфічність як до НАДФН, так і до НАДН [61].

За допомогою методів еволюційної інженерії вдалося отримати мутанти *S. cerevisiae*, здатні рости в середовищі з ксилозою. Для цього *S. cerevisiae* безперервно культивували в умовах селекційного тиску в середовищі з ксилозою протягом декількох тижнів. Отримані мутантні штамми виявляли 80-кратне зростання активності власної КДГ, чотирикратне підвищення активності КР, тоді як активність КК залишилася незмінною [47].

Було показано, що у штамів *S. cerevisiae*, які надекспресують гени, що кодують КР і КДГ *P.*

stipitis, рівень ферментації ксилози до етанолу підвищується у два рази, а формування ксиліту знижується порівняно зі штамом з незмінною активністю цих ферментів [62]. При підвищенні активності лише КР та незмінній активності КДГ спостерігається значне зниження кількості ксиліту, проте рівень алкогольної ферментації ксилози залишається незмінним. Висока активність КДГ є необхідною для покращання алкогольної ферментації ксилози, оскільки забезпечує посилення відтоку ксиліту та збільшення кількості ксилулози. Вважають, що надмірне підвищення активності КР призводить до збільшення кількості гліцерину за рахунок неспецифічного відновлення дигідроксиацетон-3-фосфату до гліцерол-3-фосфату за участю КР. В результаті відбувається регенерація НАД, який використовується у реакції КДГ, що в свою чергу призводить до зменшення кількості побічного продукту – ксиліту [63].

Ксилозоізомераза

Дисбалансу кофакторів, який створюється у двох перших реакціях метаболізму ксилози, можна уникнути, якщо б ксилоза безпосередньо перетворювалась у ксилулозу за участю прокариотного ферменту ксилозоізомерази (КІ) (ЕС 5.3.1.5) [64]. КІ каталізує ізомеризацію D-ксилози (або D-глюкози) до D-ксилулози (або D-фруктози). КІ не потребує кофакторів і тому не створює їх дисбаланс під час анаеробної ферментації ксилози. КІ бактерій поділяються на дві основні групи залежно від фізичних властивостей і структурної гомології [65]. КІ бактерій (*Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* і *Thermus*) належать до першої групи. Ці ферменти мають молекулярну масу ≈ 45 кДа з оптимальним рН у лужній області. До ферментів другої групи належать усі інші КІ (*E. coli*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermotoga*), включаючи еукаріотну КІ *Hordeum vulgare* [66]. Ферменти цієї групи мають видовжений N-термінальний регіон і, як наслідок, дещо більшу молекулярну масу ≈ 50 кДа, їх оптимальне рН наближається до нейтрального.

Експресія ксилозоізомерази в *S. cerevisiae*

Перші спроби експресії КІ у *S. cerevisiae* були невдалими. Трансформанти штамів *S. cerevisiae* генами *xylA*, що кодують КІ *Actinoplanes*

missouriensis [67] і *Clostridium thermosulphurogenes*, не виявляли активності КІ, хоча специфічна мРНК була присутня. Гетерологічна експресія генів *xylA E. coli* і *Bacillus subtilis* призводила до утворення великої кількості в більшості нерозчинного білка, який був каталітично неактивним [67]. Ген *xylA Streptomyces rubiginosus* було клоновано і експресовано у дріжджів *S. cerevisiae*, проте специфічна активність у трансформантів не визначалась. Утворений білок був нерозчинним і виділявся із клітинних лізатів лише за допомогою екстракції детергентами. Неефективні спроби експресії прокариотних КІ в дріжджах пояснювали посттрансляційними модифікаціями, формуванням інтер- або інтрамолекулярних дисульфідних містків, неоптимальним рівнем рН у дріжджовій клітині [68].

КІ термофільної бактерії *Thermus thermophilus* успішно експресували в *S. cerevisiae*, фермент виявляв специфічну активність [69]. При культивуванні рекомбінантного штама в середовищі з ксилозою в умовах обмеженої аерації спостерігалось трикратне покращання утилізації субстрату у порівнянні з вихідним штамом. Проте продукція етанолу залишалась на низькому рівні. Одна з причин неефективної ферментації полягала у недостатній активності КІ *T. thermophilus*, адже при мезофільній температурі фермент має лише залишкову активність – 0,04 МО/мг, хоча при температурному оптимумі (85 °С) активність КІ є високою і становить 1 МО/мг. Іншим негативним чинником є формування ксиліту, головним чином за участю неспецифічної НАДФН-залежної альдозоредуктази. Формування ксиліту спричинює подвійний негативний ефект на вихід етанолу: по-перше, відтік вуглецю, який потенційно міг би перетворитися в етанол; по-друге, ксиліт конкурентно інгібує КІ. Із збільшенням внутрішньоклітинної концентрації ксиліту зменшується спорідненість КІ до ксилози [69]. Для усунення інгібування активності КІ ксилітом у штамі, що містив КІ *T. thermophilus*, було делетовано ген *GRE3*, що кодує КР *S. cerevisiae*, і надекспресовано ген, що кодує ендогенну КК. При цьому формування ксиліту зменшувалось у два рази, проте штам залишався не здатним до росту на ксилозі [70]. Для збільшення питомої активності КІ при фі-

зіологічних температурах ген *xylA T. thermophilus* було мутагенізовано з використанням методу помилкової полімеразної реакції. Отримані мутантні форми КІ виявляли підвищену активність при 30 °С. Найкращий мутантний білок характеризувався десятикратним зростанням швидкості реакції у порівнянні з вихідною формою КІ. Водночас спорідненість до ксиліту була істотно знижена [71].

Ген *araA*, що кодує КІ із анаеробних целюлолітичних грибів виду *Piromyces* sp. E2, був успішно експресований у дріжджів *S. cerevisiae*. При температурі 30 °С активність гетерологічної КІ у безклітинних екстрактах становила 0,3–1,1 МО/мг білка. Сконструйований рекомбінантний штам *S. cerevisiae* ріс на середовищі з ксилозою дуже повільно [72]. Адаптований за допомогою методів еволюційної селекції штам *S. cerevisiae* набував суттєво покращеної здатності до росту в середовищі з ксилозою [21].

Експресія ксилозоізомерази у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*

Термотолерантні дріжджі *H. polymorpha* здатні до ефективної алкогольної ферментації ксилози – основного цукру гідролізатів лігноцелюлозних відходів при підвищеній температурі. Цей мікроорганізм слід розглядати як один з найбільш перспективних для застосування в алкогольній ферментації лігноцелюлозної сировини шляхом одночасної сахарифікації та ферментації [73]. На перших етапах метаболізму ксилози у *H. polymorpha*, як і у інших ксилозоферментуючих дріжджів, задіяні два ферменти – КР і КДГ. Була запропонована ідея замінити початковий етап дріжджового метаболізму ксилози на бактерійний. Для цього було сконструйовано делеційний штам *H. polymorpha* з пошкодженими КР і КДГ. Отриманий штам не здатний рости в середовищі з ксилозою. Експресія КІ *E. coli* або *Streptomyces coelicolor* під контролем сильного конститутивного промотора гена, що кодує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу, призводила до відновлення здатності мутантів *H. polymorpha* з делетованими генами *XYL1* та *XYL2* рости в середовищі, що містить ксилозу, як єдине джерело вуглецю. Активність КІ у трансформантів досягала 20–25 % від активності цього ферменту у *E.*

coli. Проте підвищення рівня алкогольної ферментації ксилози порівняно зі штамом дикого типу не спостерігалось [33]. В геномі *H. polymorpha* було ідентифіковано паралог гена КДГ, позначений як *XYL2-B*. Зворотна активність додаткової КДГ забезпечує перетворення ксилулози, утвореної в реакції КІ, в ксиліт, який інгібує КІ. Штам з делецією трьох генів *XYL1*, *XYL2-A* і *XYL2-B* та надекспресією бактерійної ізомеразу характеризувався високою активністю КІ, що становила 80 % активності ферменту у донорного штама бактерії. Однак істотного покращання алкогольної ферментації ксилози не спостерігалось [73].

Ксилулокіназа

Ксилулоза фосфорилується до ксилулозо-5-фосфата за участю третього ферменту в шляху ксилозного метаболізму – КК. Ксилулозо-5-фосфат потрапляє в ПФШ і гліколіз, перетворюючись до етанолу. КК є першим кроком ксилозного метаболізму, що є спільним для бактерій і грибів [74].

Бактеріальний ген *xylB*, що кодує КК, вперше був клонований у *E. coli* ще в 1984 р. [75]. У 1989 р. Но і Chang [76] клонували ген, що кодує КК *S. cerevisiae*, який отримав назву *XKS1*. Richard et al. [1] показали, що у *S. cerevisiae* КК є єдиним шляхом метаболізму ксилулози. Штами *S. cerevisiae* з делецією гена *XKS1* не здатні рости на середовищі з ксилулозою як єдиним джерелом вуглецю [1]. Активність КК *P. tannophilus* і *C. shehatae* є приблизно на порядок вищою порівняно з активністю цього ферменту у *S. cerevisiae* при рості в середовищі з ксилулозою. У ксилулоферментуючих дріжджів відбувається 20-кратна індукція КК при рості в середовищі з ксилулозою. Цікавим є те, що на відміну від КК *P. stipitis*, КК *S. cerevisiae* як субстрат може використовувати, окрім ксилулози, і рибулозу [1, 77]. Rodriguez-Pena et al. [78], порівнюючи геноми різних мікроорганізмів, виявили значний ступінь гомології генів КК *S. cerevisiae* і бактерій. Було здійснено делецію гена *XKS1* *S. cerevisiae* для виявлення його фізіологічного ефекту. Мутант $\Delta xks1$ добре ріс в середовищі з глюкозою, але був нездатним рости на ксилулозі. При введенні гена *XKS1* у отриманих трансформантів відновлювалась здатність рос-

ти в середовищі з ксилулозою навіть краще, ніж у штама дикого типу.

У 1998 р. були успішно сконструйовані рекомбінантні штами *S. cerevisiae*, здатні до ефективної алкогольної ферментації глюкозо-ксилозних сумішей. Унікальність цих штамів полягала в тому, що, окрім генів *XYL1* і *XYL2* *P. stipitis*, вони несли надекспресований алель власного гена *XKS1* [79]. Рекомбінантні дріжджі *S. cerevisiae*, які містять гени ксилозного метаболізму *XYL1* і *XYL2* *P. stipitis*, були здатні рости на середовищі з ксилулозою за аеробних умов і продукувати етанол за умов обмеженої аерації, проте вихід етанолу був невисоким [80]. Надекспресія ендогенної КК у таких рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* підвищувала вихід етанолу на середовищі з ксилулозою, проте ці штами ферментували ксилулозу значно гірше порівняно з *P. stipitis* і *C. shehatae* [81]. Відомо, що надекспресія трьох генів ксилозного метаболізму *XYL1*, *XYL2* і *XYL3* *P. stipitis* у пекарських дріжджах значно підвищує вихід етанолу на середовищі з ксилулозою [82]. КК *P. stipitis* істотно відрізняється від своїх найближчих гомологів. Філогенетичний аналіз показав, що відкрита рамка зчитування гена *XYL3* *P. stipitis* лише на 28 % ідентична за амінокислотною послідовністю до гена *XKS1* *S. cerevisiae*. КК *P. stipitis* містить декілька консервативних доменів, характерних для ферментів родини кіназ, серед яких важливим є домен, задіяний у зв'язуванні фосфату АТФ. Мутантні штами *P. stipitis* з делецією гена *XYL3* погано ростуть і зовсім не продукують етанол в середовищі з ксилулозою, проте утворюють значну кількість ксиліту [83]. Здатність до незначного росту на ксилулозі пояснюється існуванням іншого альтернативного шляху метаболізму ксилози у цих дріжджів [84]. Досліджуючи властивості мутантних штамів *P. stipitis* з делецією гена *XYL3*, Jin et al. [83] встановили, що ксилулоза за участю арабінітолдегідрогенази спочатку перетворюється до арабінітолу, який за участю рибулозоредуктази відновлюється до рибулози, з наступним фосфорилуванням рибулокіназою до рибулозо-5-фосфату, який надалі потрапляє в ПФШ (рис. 1). Альтернативний шлях метаболізму ксилози потребує підвищеного рівня аерації порівняно зі звичайним шляхом і не призводить до синтезу етанолу у мутантних штамів $\Delta xyl3$ *P. stipitis*. Отримані

результати добре збігаються з даними про те, що *P. stipitis* повільно росте і продукує незначні кількості етанолу на середовищі з арабінозою, хоча активність КК є в три рази вищою за активність рибулозокінази при рості на ксилозі [84].

Для підвищення рівня алкогольної ферментації ксилози у штамі *H. polymorpha Δxyl1 Δxyl2-АΔxyl2-В* було коекспресовано ген *xylA*, що кодує КІ *E. coli*, і ген *XYL3*, що кодує власну КК. Сконструйований штам характеризувався двократним підвищенням активності КК, рівень ферментації ксилози до етанолу збільшився в 4 рази порівняно з вихідним штамом [73].

Порівняння ефективності початкових шляхів ферментації ксилози у рекомбінантних дріжджів

Два рекомбінантні штами *S. cerevisiae* було використано для порівняння ефективності початкових шляхів ферментації ксилози. Штам ТМВ 3057 містив гени *XYL1* і *XYL2 P. stipitis*, тоді як штам ТМВ 3066 містив ген, що кодує КІ *Piromyces sp.* В обох штаммах були також надекспресовані гени, що кодують КК і ферменти неокислювальної частини ПФШ (транскетолаза, трансальдолаза, рибулозо-5-фосфатізомераза, і рибулозо-5-фосфатепімераза), а також делетовано ген *GRE3*, що кодує неспецифічну альдозоредуктазу. Було показано, що за умов ферментації в мінеральному середовищі ксилоза в 2,4 рази краще утилізувалась штамом ТМВ 3057 (КР-КДГ) порівняно зі штамом ТМВ 3066 (КІ). Вихід етанолу у штама ТМВ 3057 (КР-КДГ) також був у два рази вищим. Проте штам ТМВ 3066 (КІ) на відміну від штама ТМВ 3057 (КР-КДГ) під час ферментації практично не нагромаджував побічних продуктів, таких як ксиліт, ацетат і гліцерин [85]. Отже, конструювання ефективних ферментаторів ксилози на основі бактеріальної КІ потребує подальшого поліпшення. В підсумку варто додати, що на теперішній момент не існує одностайної думки стосовно того, який з початкових шляхів утилізації ксилози є ефективнішим, бактеріальний чи дріжджовий. І хоча перші ланки метаболізму ксилози є лімітуючими на шляху ефективної алкогольної ферментації цукрів лігноцелюлозних гідролізатів, проте у синтезі етанолу залучені й інші, не менш важливі ланки та аспекти, яким при-

свячено багато робіт, а саме ПФШ, гліколіз, окислення пірувату, блокування реутилізації утвореного етанолу, зниження чутливості мікроорганізмів до синтезованого етанолу, обмеження зростання біомаси, регуляція синтезу етанолу, розробка ефективних методів селекції продуцентів етанолу тощо. Враховуючи першочерговість та гостроту світових проблем енергозабезпечення та екологічного балансу, слід сподіватися, що у недалекій перспективі будуть створені ефективні організми – продуценти етанолу з поновлюваної сировини.

SUMMARY. Plant biomass possesses a huge potential as a source for biofuel production. The main components of biomass are glucose and five-carbon sugar xylose. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* that is used for industrial ethanol production from glucose is unable to xylose fermentation. Therefore a microorganism capable for efficient fermentation of both glucose and xylose has to be found in nature or constructed for economically feasible biomass conversion to ethanol. The active xylose fermentation could be performed by increasing the efficiency of initial stages of xylose metabolism [1]. In this review the enzymes of initial stages of xylose metabolism in yeasts (xylose reductase, xylitol dehydrogenase, xylulokinase) and bacteria (xylose isomerase and xylulokinase) are characterized. The ways for construction of yeast strains capable of efficient alcoholic xylose fermentation are discussed.

РЕЗЮМЕ. Растительная биомасса обладает огромным потенциалом в качестве сырья для производства биотоплива, в частности топливного этанола. Основными составными растительной биомассы являются глюкоза и пятиуглеродный сахар ксилоза. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые используются для промышленного производства этанола из глюкозы, не способны ферментировать ксилозу. Следовательно, для обеспечения экономически выгодного превращения растительной биомассы в этанол необходимо найти в природе или сконструировать микроорганизм, активно ферментирующий не только глюкозу, но и ксилозу. Обеспечить повышение ферментации ксилозы можно, обеспечив эффективность начальных этапов метаболизма этой пентозы, которые определяют и эффективность алкогольной ферментации в целом. В настоящем обзоре детально охарактеризованы ферменты, задействованные на начальных этапах метаболизма ксилозы у дрожжей (ксилоредуктаза, ксилитолдегидрогеназа и ксилулокиназа) и бактерий (ксилозиизомераза и ксилулокиназа), а также рассмотрены пути конструирования штаммов дрожжей – эффективных продуцентов этанола из ксилозы.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Richard P., Toivari M.H., Pentilla M. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – **190**. – P. 39–43.
2. Does A.L., Bisson L.F. Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heeidi* and *Pichia stipitis* // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – **55**. – P. 159–164.
3. Lucas C., Vanuden N. Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1986. – **23**. P. 491–495.
4. Leandro M.J., Goncalves P., Spencer-Martins I. Two glucose/xylose transporter genes from *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter // Biochem. J. – 2006. – **395**. – P. 543–549.
5. Weierstall T., Hollenberg C.P., Boles E. Cloning and characterization of three genes (SUT1–3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis* // Mol. Microbiol. – 1999. – **31**. – P. 871–883.
6. Hamacher T., Becker J., Gardonyi M., Hahn-Hagerdal B., Boles E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization // Microbiology. – 2002. – **148**(Pt 9). – P. 2783–2788.
7. Kotter P., Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1993. – **38**. – P. 776–783.
8. Kruckeberg A.L. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae* // Arch. Microbiol. – 1996. – **166**. – P. 283–292.
9. Boles E., Hollenberg C.P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts // FEMS Microbiol. Rev. – 1997. – **21**. – P. 85–111.
10. Bisson L.F. High-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control // J. Bacteriol. – 1988. – **170**. – P. 4838–4845.
11. Bisson L.F., Fraenkel D.G. Expression of kinase-dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol. – 1984. – **159**. – P. 1013–1017.
12. Busturia A., Lagunas R. Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Gen. Microbiol. – 1986. – **132**. – P. 379–385.
13. Hamaher T., Becker J., Gardonyi M., Hahn-Hagerdal B., Boles E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization // Microbiology. – 2002. – **148**. – P. 2783–2788.
14. Wiczorke R., Krampe S., Wierstall T., Freidel K., Hollenberg C.P., Boles E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett. – 1999. – **464**. – P. 123–128.
15. Diderich J.A., Schepper M., van Hoek P., Luttik M.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**. – P. 15350–15359.
16. Batista A.S., Miletti L.C., Stambuk B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – **8**. – P. 26–33.
17. Alexander M.A., Yang V.W., Jeffries T.W. Levels of pentosephosphate pathway enzymes from *Candida shehatae* in continuous culture // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1988. – **29**. – P. 282–288.
18. Verho R., Londesborough, Penttila M., Richard P. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. and Environ. Microbiol. – 2003. – **10**. – P. 5892–5897.
19. Bruinenberg P.M., de Bot P.H.M., van Dijken J.P., Scheffers W.A. The role of the redox balance in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1983. – **18**. – P. 287–292.
20. Wahlbom C.F., Hahn-Hagerdal B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // Biotechnol. Bioeng. – 2002. – **78**. – P. 172–178.
21. Kuyper M., Winkler A.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle // FEMS Yeast Res. – 2004. – **4**. – P. 655–664.
22. Blank L.M., Lehmbeck F., Sauer U. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts // FEMS Yeast Res. – 2005. – **5**. – P. 545–558.
23. Bruinenberg P.M., van Dijken J.P., Scheffers W.A. An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis* // J. Gen. Microbiol. – 1983. – **129**. – P. 965–971.
24. Nissen T.L., Anderlund M., Nielsen J., Villadsen J., Kielland-Brandt M.C. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool // Yeast. – 2001. – **18**. – P. 19–32.
25. Grimshaw C.E. Aldose reductase: model for a new paradigm of enzymic perfection in detoxification catalysis // Biochemistry. – 1992. – **34**. – P. 8299–8308.
26. Amore R., Koetter P., Kuester C., Ciriacy M., Hollenberg C.P. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent xylose reductase-encoding gene (*XYLI*) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis* // Gene. – 1991. – **109**. – P. 89–97.
27. Hallborn J., Walfridsson M., Airaksinen U., Ojamo H., Hahn-Hagerdal B., Pentilla M., Keranen S. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // Bio. Technology. – 1991. – **9**. – P. 1090–1095.
28. Yokoyama S., Kinoshita Y., Suzuki T., Kawai K., Horitsu H., Takamizawa K. Cloning and sequencing of two D-xylose reductase genes (*xyrA* and *xyrB*) from

- Candida tropicalis* // J. Ferment. Bioeng. — 1995. — **80**. — P. 603–605.
29. Billard P., Menart S., Fleer R., Bolotin-Fukuhara M. Isolation and characterization of the gene encoding xylose reductase from *Kluyveromyces lactis* // Gene. — 1995. — **162**. — P. 93–97.
 30. Bolen P.L., Hayman G.T., Shepherd H.S. Sequence and analysis of aldose (xylose) reductase gene from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus* // Yeast. — 1996. — **12**. — P. 1367–1375.
 31. Neuhauser W., Haltrich D., Kulbe K.D., Nidetzky B. NAD(P)H-dependent aldose reductase from the xylose-assimilating yeast *Candida tenuis*. Isolation, characterization and biochemical properties of the enzyme // Biochem. J. — 1997. — **326**. — P. 683–692.
 32. Lee J.-K., Koo B.-S., Kim S.-Y. Cloning and characterization of the *XYL1* gene, encoding an NADP-prefering xylose reductase from *Candida parapsilopsis*, and its functional expression in *Candida tropicalis* // Appl. and Environ. Microbiol. — 2003. — **69**. — P. 6179–6188.
 33. Voronovsky A.Y., Ryabova O.B., Verba O.B., Ischuk O.P., Dmytruk K.V., Sibirny A.A. 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.
 34. Kuhn A., van Zyl C., van Tonder A., Prior B.A. Purification and partial characterization of an aldoketo reductase from *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — **61**. — P. 1580–1585.
 35. Verduyn C., van Kleef R., Frank J., Schreuder H., van Dijken J.P., Scheffers W.A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* // Biochem. J. — 1985. — **226**. — P. 669–677.
 36. Bruinenberg P.M., de Bot P.H.M., van Dijken J.P., Scheffers W.A. NADH-linked aldose reductase: the key to ethanolic fermentation of xylose by yeasts // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1984. — **19**. — P. 256–260.
 37. Jin Y.S., Laplaza J.M., Jeffries T.W. *Saccharomyces cerevisiae* engineering for xylose metabolism exhibits a respiratory response // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — **70**. — P. 6826–6825.
 38. Garay-Arroyo A., Covarrubian A.A. Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. — 1999. — **15**. — P. 879–892.
 39. Traft K.L., Otero-Cordero R.R., Van Zyl W.H., Hahn-Hagerdal B. Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xylA* and *XKS1* genes // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — **67**. — P. 5668–5674.
 40. Traff K.L., Jonsson L.J., Hahn-Hagerdal B. Putative xylose and arabinose reductase in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. — 2002. — **19**. — P. 1233–1241.
 41. Richard P., Toivari M.H., Penttil M. Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase // FEBS Lett. — 1999. — **457**. — P. 135–138.
 42. Habenicht A., Motejadded H., Kiess M., Wegere A., Mattes R. Xylose utilization: Cloning and characterisation of the xylitol dehydrogenase from *Galactocandida mastodermitis* // Biol. Chem. — 1999. — **380**. — P. 1405–1411.
 43. Seiboth B., Hartl L., Pail M., Kubicek C.P. D-Xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*: Loss of the xylitol dehydrogenase step can be partially compensated for by *lad1*-Encoded L-arabinitol-4-dehydrogenase // Eukaryot. Cell. — 2003. — **2**. — P. 867–875.
 44. Tran L.H., Kitamoto N., Kawai K., Takamizawa K., Suzuki T. Cloning and expression of a NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase gene (*xylA*) of *Aspergillus oryzae* // J. Biosci. Bioeng. — 2004. — **97**. — P. 419–422.
 45. Boer E., Wartmann T., Schmidt S., Bode R., Gellissen G., Kunze G. Characterization of the *AXDH* gene and the encoded xylitol dehydrogenase from the dimorphic yeast *Arxular adenivorans* // Antonie van Leeuwenhoek. — 2005. — **87**. — P. 233–243.
 46. Ko B.S., Jung H.C., Kim J.H. Molecular cloning and characterization of NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis* ATCC 20913 // Biotechnol. Prog. — 2006. — **22**. — P. 1708–1714.
 47. Attfield P.V., Bell P.J. Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source // FEMS Yeast Res. — 2006. — **6**. — P. 862–868.
 48. Sarthy A.V., Schopp C., Idler K.B. Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. — 1994. — **140**. — P. 121–126.
 49. Rizzi M., Harwart K., Buithanh N.A., Dellweg H. A kinetic-study of the NAD⁺-xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis* // J. Ferment. Bioeng. — 1989. — **67**. — P. 25–30.
 50. Ko B.S., Kim J., Kim J.H. Production of xylitol from D-xylose by a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis* // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — **72**(6). — P. 4207–4213.
 51. Ko B.S., Rhee C.H., Kim J.H. Enhancement of xylitol productivity and yield using a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis* under fully aerobic conditions // Biotechnol. Lett. — 2006. — **28**(15). — P. 1159–1162.
 52. Hahn-Hagerdal B., Wahlbom C.F., Gardonyi M., van Zyl W.H., Cordero Otero R.R., Jonsson L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. — 2001. — **73**. — P. 53–84.
 53. Anderlund M., Rådström P., Hahn-Hägerdal B. Expression of bifunctional enzymes with xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisi-*

- ae* alters product formation during xylose fermentation // *Metab. Eng.* – 2001. – **3**(3). – P. 226–235.
54. Zhang Y., Lee H. Site-directed mutagenesis of the cysteine residues in the *Pichia stipitis* xylose reductase // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – **147**(2). – P. 227–232.
 55. Kostrzynska M., Sopher C., Lee H. Mutational analysis of the role of the conserved lysine-270 in the *Pichia stipitis* xylose reductase // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – **159**. – P. 107–112.
 56. Jeppsson M., Bengtsson O., Katja F., Lee H., Hahn-Hagerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K_M for NADPH increases ethanol production from xylose recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // *Biotechnol. Bioeng.* – 2006. – **93**. – P. 665–673.
 57. Watanabe S., Pack S.P., Salen A.A., Annaluru N., Kodaki T., Makino K. The positive effect of the decreased NADPH-preffering activity of xylose reductase from *Pichia stipitis* on ethanol production using xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2007. – **71**(5). – P. 1365–1369.
 58. Metzger M.H., Hollenberg C.P. Amino acid substitutions in the yeast *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase coenzyme-binding domain affect the coenzyme specificity // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – **228**(1). – P. 50–54.
 59. Watanabe S., Kodaki T., Makino K. Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zink // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**(11). – P. 10340–10349.
 60. Watanabe S., Saleh A.A., Pack S.P., Annaluru N., Kodaki T., Makino K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase // *J. Biotechnol.* – 2007. – **130**(3). – P. 316–319.
 61. Toivari M.H., Salusjarvi L., Ruohonen L., Penttila M. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – **6**. – P. 3681–3686.
 62. Karhumaa K., Fromanger R., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – **73**. – P. 1039–1046.
 63. Jeppsson M., Träff K., Johansson B., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* – 2003. – **3**. – P. 167–175.
 64. Jeffries T.W., Jin Y.S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeast // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2000. – **47**. – P. 221–268.
 65. Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase // *Microbiol. Rev.* – 1996. – **60**(2). – P. 280–300.
 66. Kristo P., Saarelainen R., Fagerstrom R., Aho S., Korhola M. Protein purification, and cloning and characterization of the cDNA and gene for xylose isomerase of barley // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – **237**(1). – P. 240–246.
 67. Amore R., Hollenberg C.P. Xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: primary structure of the gene and the protein // *Nucl. Acids Res.* – 1989. – **17**(18). – P. 7515.
 68. Gardonyi M., Hahn-Hagerdal B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* // *Enzyme and Microbial. Technol.* – 2003. – **32**. – P. 252–259.
 69. Walfridsson M., Bao X., Anderlund M., Lilius G., Bulow L., Hahn-Hägerdal B. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – **62**. – P. 4648–4651.
 70. Träff K.L., Otero Cordero R.R., van Zyl W.H., Hahn-Hägerdal B. Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xylA* and *XKS1* genes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – **67**. – P. 5668–5674.
 71. Lonn A., Gardonyi M., van Zyl W., Hahn-Hägerdal B., Otero R.C. Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. Gene cloning and protein characterization // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – **269**. – P. 157–163.
 72. Kuyper M., Harhangi H.R., Stave A.K., Winkler A.A., Jetten M.S., de Laat W.T., den Ridder J.J., Op den Camp H.J., van Dijken J.P., Pronk J.T. High-level functional expression of fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* – 2003. – **4**. – P. 69–78.
 73. Dmytruk O.V., Voronovsky A.Y., Abbas C.A., Dmytruk K.V., Ishchuk O.P., Sibirny A.A. Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* // *FEMS Yeast Res.* – 2007. – **127** (PMID: 17662053).
 74. Jeffries T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 1983. – **27**. – P. 1–32.
 75. Rosenfeld S.A., Stevis P.E., Ho N.W.Y. Cloning and characterization of the *xyl* genes from *Escherichia coli* // *Mol. Gen. Genet.* – 1984. – **194**. – P. 410–415.
 76. Ho N.W.Y., Chang S.F. Cloning of yeast xylulokinase gene by complementation of *Escherichia coli* and yeast mutations // *Enzyme and Microbial. Technol.* – 1989. – **11**. – P. 417–421.

77. Flanagan T., Waites M.J. Purification and characterization of D-xylulokinase from the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* CBS 5773 // Enzyme and Microbial. Technol. – 1992. – **14**. – P. 975–979.
78. Rodriguez-Peña J.M., Cid V.J., Arroyo J., Nombela C. The YGR194c (*XKS1*) gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – **162**(1). – P. 155–160.
79. Ho N.W., Chen Z., Brainard A.P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – **64**. – P. 1852–1859.
80. Jin Y.S., Lee T.H., Choi Y.D., Ryu Y.W., Seo J.H. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing genes for xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Pichia stipitis* // J. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – **10**. – P. 564–567.
81. Toivari M.H., Aristidou A., Ruohonen M., Penttilä M. Conversion of xylose into ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen availability // Metabol. Eng. – 2001. – **3**. – P. 236–349.
82. Jeffries T.W. Engineering yeasts for xylose metabolism // Curr. Opin. Biotechnol. – 2006. – **17**. – P. 320–326.
83. Jin Y.S., Cruz J., Jeffries T.W. Xylitol production by a *Pichia stipitis* D-xylulokinase mutant // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **68**. – P. 42–45.
84. Jin Y.S., Jones S., Shi N.Q., Jeffries T.W. Molecular cloning of *XYL3* (D-xylulokinase) from *Pichia stipitis* and characterization of its physiological function // Appl. and Environ. Microbiol. – 2001. – **68**. – P. 1232–1239.
85. Karhumaa K., Sanchez R.G., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Cell Factor. – 2007. – **6**. – P. 5.

Надійшла 10.09.07