

УДК 579.66

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТАНОЛА ИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ

© 2014 г. А.С. Розанов, А.В. Котенко, И.Р. Акбердин, С.Е. Пельтек

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: rozanov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 16 октября 2014 г. Принята к публикации 23 октября 2014 г.

Saccharomyces cerevisiae является наиболее подходящим и используемым организмом для промышленного получения биоэтанола из сахаров, так как дрожжи имеют высокие темпы роста, ферментации и наработки этанола в анаэробных условиях, а также они устойчивы к высоким концентрациям этанола и низким значениям pH. Наиболее перспективным источником сахаров считается лигноцеллюлозная биомасса. Сахара, полученные из лигноцеллюлозной биомассы, являются смесью гексоз и пентоз. Однако используемые штаммы *S. cerevisiae* слабо приспособлены к сбраживанию пентасахаридов, в связи с чем необходима оптимизация метаболизма существующих в настоящее время продуцентов биоэтанола, направленная на использование пентасахаров. В работе представлен обзор существующих в мире подходов, разработанных для решения этой задачи с помощью рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae*.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, лигноцеллюлозная биомасса, утилизация ксилозы, биоэтанол, штаммы-продуценты, генетическая модификация.

ВВЕДЕНИЕ

Использование дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* считается крайне перспективным подходом для преобразования растительной биомассы в жидкое топливо, в основном биоэтанол. Кроме того, в настоящее время в мире активно разрабатываются модифицированные дрожжи вида *S. cerevisiae*, способные производить и другие продукты, кроме биоэтанола, такие как бутанол, молочная кислота и сукцинат (Steen *et al.*, 2008; Jayaram *et al.*, 2014; Mimitsuka *et al.*, 2014). В плане получения топливного этанола из растительной биомассы основные усилия исследовательских групп направлены на создание процесса получения биоэтанола низкой стоимости из лигноцеллюлозной биомассы. Согласно расчетам, таким характеристикам могут удовлетворять технологии, в которых часть этапов, например, осахаривание и ферментация, выполняются одновременно (Ojeda *et al.*, 2011). Несмотря на развитие знаний

и технологий, направленных на разработку продуцентов микробного происхождения, *S. cerevisiae* остаются наиболее перспективным и востребованным в этом направлении видом, в связи с чем актуален вопрос их модификации для формирования на основе рекомбинантных штаммов интегрированных биотехнологических процессов. Существующие в настоящее время штаммы нуждаются в доработке следующих свойств (Geddes *et al.*, 2011): использование пентасахаров, оптимизация биосинтеза этанола, наработка белков для их использования в прямой конверсии лигноцеллюлозы в этанол или для предварительного гидролиза.

Введение и оптимизация пути утилизации пентасахаров в дрожжах вида *S. cerevisiae*

Биоэтанол получают из сахаро- и крахмалосодержащего сырья. В результате сельскохозяйственной деятельности кроме сахаров,

получаемых в виде крахмала и дисахаридов, остаются отходы в виде лигноцеллюлозной биомассы, которую необходимо утилизировать. В связи с этим лигноцеллюлоза является перспективным источником сахаров с низкой стоимостью. Лигноцеллюлоза состоит из трех основных компонентов: целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, из них только целлюлоза и гемицеллюлоза могут быть использованы в качестве сырого материала для получения этанола. В результате гидролиза получают смесь сахаров, основными компонентами которой являются глюкоза и ксилоза. Содержание ксилозы довольно высоко в травах и древесине, поэтому для налаживания экономически выгодного процесса переработки лигноцеллюлозной биомассы в этанол требуется эффективный продуцент этанола, способный утилизировать помимо глюкозы еще и ксилозу.

В силу специфики используемого до настоящего времени субстрата – крахмал- и сахарозосодержащих растений, были отобраны микроорганизмы, эффективно сбраживающие гекозы. Наиболее технологически эффективными продуцентами оказались *S. cerevisiae* (Lin, Tanaka, 2006), но дикие штаммы *S. cerevisiae* не способны использовать ксилозу в качестве источника углерода. На схеме изображен метаболизм ксилозы, осуществляемый грибами и бактериями. Процесс превращения ксилозы в

ксилозу большинства грибов и ксилозоутилизирующих дрожжей (*Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* и *Candida shehatae*) проходит в два этапа: на первом этапе работает фермент NADPH-зависимая ксилоредуктаза (XR, EC 1.1.1.307), осуществляющий превращение ксилозы в ксилитол, на втором этапе с помощью фермента NAD⁺-зависимая ксилитолдегидрогеназа (XDH, EC 1.1.1.B19) ксилитол переходит в ксилулозу. Далее фермент ксилулокиназа (XK, EC 2.7.1.17) проводит фосфорилирование ксилулозы с образованием ксилулозы-5-фосфат, дальнейший метаболизм проходит через пентозофосфатный шунт. С другой стороны, существует еще один путь утилизации ксилозы, представленный в бактериях. При этом ксилоза напрямую изомеризуется в ксилулозу с помощью фермента ксилоизомеразы (XI, EC 5.3.1.5). Далее, так же как и у грибов, ксилулоза фосфорилируется ксилулокиназой (XK) в ксилулозо-5-фосфат и переходит в пентозофосфатный путь.

Экспрессия экзогенных ферментов ксилоредуктазы и ксилитолдегидрогеназы

В 1990 г. была впервые получена линия дрожжей *S. cerevisiae*, способная расти на среде с ксилозой в качестве единственного источника углерода (Kötter *et al.*, 1990). Тогда это было достигнуто за счет генетической модификации: экспрессии ферментов XR и XDH, принадлежащих другому виду дрожжей *P. stipitis*. Таким образом, была получена линия дрожжей *S. cerevisiae*, способная перерабатывать и глюкозу, и ксилозу, но, к сожалению, концентрация целевого продукта – этанола – была низкой. Позже это было объяснено тем, что ферменты, участвующие в превращении ксилозы в ксилулозу, имеют разную коферментную специфичность. XR в качестве кофермента может использовать NADH и NADPH, а фермент XDH – только NAD⁺. Поэтому возникает избыток кофермента NADP⁺ и недостаток NAD⁺. В результате, в анаэробных условиях возникает несбалансированность коферментов, приводящая к преимущественному образованию ксилитола, а не биоэтанола (Kötter, Ciriacy, 1993). К настоящему времени было предпринято множество попыток оптимизации биосинтеза этанола, основанного



на гетерологичной экспрессии ферментов XR и XDH. В одной из работ 2012 г. был получен мутантный ген, кодирующий фермент ксилозоредуктазы (XR^{MUT}) с измененной кофакторной специфичностью – вместо NADH и NADPH полученный фермент мог использовать только NADH (Lee *et al.*, 2012). Результатом исследования было создание линии дрожжей *S. cerevisiae* с повышенным уровнем экспрессии XR^{MUT}, что позволило уменьшить накопление ксилитола.

Также было показано, при делеции гена *PHO13*, кодирующего фермент, проводящий дефосфорилирование ксилулозы-5-фосфата (X5P), или мутации, приводящей к потере активности этого фермента, происходит улучшение фенотипических свойств продуцента (Kim *et al.*, 2013a).

Были описаны и другие подходы к преодолению дисбаланса коферментов. Используя инженерию белков, была получена линия дрожжей *S. cerevisiae*, содержащая мутантный фермент ксилитол дегидрогеназа (XDH) с измененным предпочтением кофермента – NADP⁺ вместо NAD⁺, что позволило уменьшить накопление ксилитола и увеличить выход этанола (Khattab *et al.*, 2013).

В рамках другого исследования с помощью методов направленного мутагенеза был получен набор рекомбинантных линий *S. cerevisiae*, содержащих новый набор мутантных генов: строго NADPH-зависимых XR и NADP⁺-зависимых XDH, а также с увеличенным уровнем экспрессии эндогенной XK.

Еще один подход, с помощью которого удалось увеличить выход этанола на 60% – экспрессия глюкосомальной NADH-зависимой фумарат редуказы (FRD, EC 1.3.1.6) из *Trypanosoma brucei* (Salusjärvi *et al.*, 2013). Экспрессия FRD позволяет понизить уровень накопления ксилитола, так как в результате работы этого фермента образуется NAD⁺, что приводит к установлению соответствующего окислительно-восстановительного баланса.

В более ранней работе была описана линия дрожжей *S. cerevisiae*, экспрессирующая ген фермента GAPDH (EC 1.2.1.12) из *Kluveromyces lactis*, что позволило добиться увеличения пула NADPH (Bera *et al.*, 2011). Экспрессия этого гена в клетке *S. cerevisiae* позволила уменьшить накопление ксилитола на

40 %. В настоящее время существуют подходы, основанные на определении типа скрещивания штаммов *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 2013b). С применением этого метода в результате скрещивания двух гаплоидных линий дрожжей была получена диплоидная гетерозиготная линия, объединяющая молекулярно-генетические характеристики двух гаплоидных линий для увеличения биосинтеза этанола.

Экспрессия экзогенного фермента ксилозоизомераса

Еще один из способов активации метаболизма ксилозы в дрожжах *S. cerevisiae* – гетерологичная экспрессия гена, кодирующего фермент ксилозоизомераса (XI), но этот путь является довольно сложным для реализации. При первых попытках активации метаболизма этим путем не удавалось добиться экспрессии функционально-активного белка, что, скорее всего, было связано с неправильной упаковкой белка, а также посттрансляционными модификациями (Matsushika *et al.*, 2009).

В 1996 г. впервые была получена линия *S. cerevisiae*, экспрессирующая функциональный белок XI бактериального происхождения *Thermus thermophilus* (Walfridsson *et al.*, 1996). Несмотря на то что экспериментально была показана наработка функционального белка, не удалось добиться его высокой активности, поэтому уровень потребления ксилозы был довольно низок.

Позже в геном *S. cerevisiae* были встроены гены фермента XI грибного происхождения: из грибов рода *Piromyces* (Kuiper *et al.*, 2003) и позже *Orpinomyces* (Madhavan *et al.*, 2009). Экспериментально была показана наработка функционального белка XI на довольно высоком уровне, но скорость роста дрожжей на ксилозе оставалась очень низкой.

Также было проведено встраивание оптимизированного гена XI бактериального происхождения из *Burkholderia cenocepacia* (De Figueiredo *et al.*, 2013). В результате удалось добиться пятикратного увеличения уровня потребления ксилозы и приблизительно 1,5-кратного увеличения уровня наработки этанола. Стоит отметить, что не было также замечено накопления ксилитола в клетке. Полученные

данные свидетельствуют о том, что экспрессия кодон-оптимизированной ксилозоизомеразы позволяет преодолеть окислительно-восстановительный дисбаланс и перерабатывать ксилозу до ксилулозы. Выход этанола может быть ограничен следующими факторами: одиночная копия встроенного гена *xyIA*, а также низкая активность нативного гена ксилулокиназы (ХК) (Yu *et al.*, 2011).

В 2013 г. была получена линия дрожжей *S. cerevisiae* с интегрированным геном *XI Clostridium cellulovorans*, кодируемый фермент которого был представлен на внешней поверхности клеточной стенки (Ota *et al.*, 2013). Полученная линия дрожжей хорошо росла на среде, содержащей ксилозу в качестве единственного источника углерода, и напрямую продуцировала этанол из ксилозы в анаэробных условиях.

Подходы к улучшению ферментации

Помимо включения пути превращения ксилозы в ксилулозу для получения эффективного продуцента биоэтанола необходимо также провести ряд генетических модификаций центрального метаболизма дрожжей *S. cerevisiae*. Основные из них: увеличение уровня экспрессии эндогенной ксилулокиназы, встраивание транспортеров ксилозы и модификация пентозофосфатного пути.

Увеличение уровня экспрессии ксилулокиназы

Дикие штаммы дрожжей *S. cerevisiae* способны утилизировать ксилулозу – кетоизомер ксилозы, но с довольно низкой скоростью (Wang, Schneider, 1980). На первом этапе происходит фосфорилирование ксилулозы ферментом ксилулокиназа с образованием ксилулозо-5-фосфата, далее образовавшееся соединение поступает в пентозофосфатный путь. Невысокая скорость потребления ксилулозы может быть объяснена низким уровнем активности нативной ксилулокиназы, что также может оказывать негативное влияние на ферментацию ксилозы рекомбинантными штаммами *S. cerevisiae* (Deng, Ho, 1990).

Встраивание белков-транспортеров ксилозы

У дрожжей вида *S. cerevisiae* нет специфичных транспортеров ксилозы, и транспорт ксилозы в клетку, в основном, происходит путем диффузии через неспецифичные транспортеры гексоз, кодируемые семейством генов *HXT* (Kruckeberg, 2006). Эти транспортеры обладают значительно меньшей аффинностью к ксилозе по сравнению с глюкозой, поэтому ее потребление начинается лишь после истощения запасов глюкозы (Kötter, Ciriacy, 1993). Поэтому встраивание в геном дрожжей специфичных транспортеров ксилозы может оказать положительное влияние на ферментацию ксилозы.

Эксперименты по экспрессии гетерологичных транспортеров ксилозы были проведены на основе выделения следующих генов транспортеров *Gxf1*, *Sut1* и *At5g59250* из *Candida intermedia*, *Pichia stipitis* и *Arabidopsis thaliana* соответственно (Hector *et al.*, 2008; Katahira *et al.*, 2008; Runquist *et al.*, 2009). Позже был проведен их сравнительный анализ, и было показано, что линия с транспортером *Gxf1* обладает наибольшей скоростью потребления ксилозы, а также и наибольшей скоростью роста (Runquist *et al.*, 2010).

В качестве альтернативного пути были предприняты попытки изменения специфичности транспортера с гексоз на ксилозу путем изменения мотива, обнаруженного в первом трансмембранном домене (Young *et al.*, 2014). Однако все же транспорт ксилозы посредством полученных мутантных белков ингибируется глюкозой.

Модификация пентозофосфатного пути

Единственный путь включения ксилулозы в гликолиз идет через пентозофосфатный путь (ПФП). Однако по сравнению с другими видами дрожжей интенсивность ПФП у *S. cerevisiae* является низкой (Fiaux J. *et al.*, 2003). Поэтому для получения эффективного продуцента биоэтанола необходимо увеличить активность следующих ферментов неокислительного пентозофосфатного пути: трансальдолаза (ЕС 2.2.1.2), транскетолаза (ЕС 2.2.1.1), рибулозо-5-фосфат 3-эпимераза (ЕС 5.1.3.1) и рибозо-5-

фосфат кето-изомеразы (ЕС 5.3.1.6) (Kuypers *et al.*, 2005a). Для получения линии, эффективно ферментирующей ксилозу до этанола, и ее применения в промышленном производстве необходимо оптимизировать уровень экспрессии ферментов всего ферментативного пути (Lu, Jeffries, 2007).

Другие подходы по модификации дрожжей, утилизирующих ксилозу

В дополнение к методам направленной метаболической инженерии для получения линии дрожжей, утилизирующих ксилозу, также применяются методы естественной селекции и спонтанного мутагенеза (Sauer, 2001). Настоящий подход был применен и к линиям, экспрессирующим ксилоредуктазу и ксилитолдегидрогеназу (Sonderegger, Sauer, 2003), и ксилозиомеразу (Kuypers *et al.*, 2004).

Применение данного подхода позволяет улучшить свойства ксилитоутилизирующих линий: например, увеличить скорость потребления ксилозы (Liu, Hu, 2010); ускорить рост в анаэробных условиях (Zhou *et al.*, 2012); вывести линии, устойчивые к различным ингибирующим факторам (Çakar *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2007); улучшить ферментацию смеси глюкозы и ксилозы (Kuypers *et al.*, 2005b).

Экспрессия белков, участвующих в деградации лигноцеллюлозной биомассы в дрожжах

Преобразование лигноцеллюлозного материала в биоэтанол и другие продукты с применением биотехнологических методов требует ферментативной конверсии биополимеров до моносахаров, которые могут быть ассимилированы микроорганизмами. При этом значительное увеличение стоимости конечного продукта происходит из-за стоимости используемых ферментативных препаратов. Снижения затрат на эту статью расходов можно добиться несколькими путями: повышением эффективности используемых ферментативных комплексов, наработкой ферментативных комплексов в процессе ферментации и совместным проведением ферментативного гидролиза и ферментации.

Дрожжи известны как хорошие продуценты ферментов и используются для получения рекомбинантных белков медицинского и промышленного назначения. Основной причиной популярности использования дрожжей являются легкость культивирования и достаточно активный синтез белка (Çelik, Çalik, 2012). Наиболее перспективными для получения при спиртовом брожении являются белки, используемые в ферментативном гидролизе растительной биомассы.

В этом направлении ведется значительное количество работ: были получены продуценты отдельных белков, участвующих в разрушении лигноцеллюлозной биомассы. Для изучения возможности наработки белков, необходимых для разрушения лигноцеллюлозной биомассы в дрожжах, были созданы продуценты основных ферментов, участвующих в разрушении лигноцеллюлозной биомассы: эндоглюканаза (ЕС 3.2.1.4) (Chen *et al.*, 2012; Mormeneo *et al.*, 2012; Wilde *et al.*, 2012), экзоглюканаза (ЕС 3.2.1.91) (Cho *et al.*, 1999; Ilmén *et al.*, 2011), β -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21) (Wilde *et al.*, 2012; Gurgu *et al.*, 2011), ксиланазы (ЕС 3.2.1.8) (Fujii *et al.*, 2011; Karaoglan *et al.*, 2014; Kirikyali, Connerton, 2014). В связи с перспективой использования дрожжей для ферментации пентасахаров в их геном были клонированы ферменты, обладающие гликолитическими активностями, направленными на разрушение гемицеллюлозы (Ahmed *et al.*, 2009).

В ходе использования дрожжей в качестве продуцентов белков, обладающих ферментативной активностью, выяснилось, что из-за гипергликозилирования, присущего многим видам дрожжей, снижается выход активного рекомбинантного белка. Этот факт послужил импульсом для проведения серии работ, посвященных исследованию мутантных штаммов с нокаутами части генов ферментов, участвующих в процессах гликозилирования в клетках *S. cerevisiae* (Kitagawa *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). В этих работах удалось повысить наработку целевых белков за счет нокаута генов ферментов, участвующих в гликозилировании белка в процессе белкового синтеза *S. cerevisiae*. Введение в геном ферментов, обладающих функциональными активностями для разрушения растительной биомассы, имеет

основной целью не только получение штамма-продуцента, который мог бы ферментировать не отдельные сахара, а предобработанную в разной степени лигноцеллюлозу, но и также продукцию ферментативных комплексов в ходе сбраживания сахаров.

Помимо создания штаммов-продуцентов отдельных ферментов были получены продуценты нескольких ферментов целлюлозолитического комплекса. В большинстве случаев были проведены исследования гидролитических возможностей этих штаммов на различных компонентах растительной биомассы. В работе Ван Вука с соавт. (Van Wyk *et al.*, 2010) процессивная эндоглюконаза Cel9A из *Thermobifida fusca* была экспрессирована в клетках *S. cerevisiae* совместно с белками из *Trichoderma reesei*: двумя эндоглюконазами cel5A (egII), cel7B (egI) и двумя экзоглюконазами cel6A (cbhII), cel7A (cbhI). Во всех случаях наблюдалось увеличение активности ферментов целлюлозолитического комплекса. В работе Ямада с соавт. (Yamada *et al.*, 2011) был создан штамм, эффективно экспрессирующий три основных фермента, участвующих в разложении целлюлозы. С использованием этого штамма на среде, содержащей предобработанную фосфорной кислотой целлюлозу, удалось получить 7,6 г/л биоэтанола за 72 ч ферментации.

Для изучения процесса получения спирта из микрокристаллической целлюлозы были выделены несколько штаммов, экспрессирующих: *T. aurantiacus* EGI (эндоглюконаза), *T. reesei* СВНП (экзоглюконаза) и *Aspergillus aculeatus* BGLI (β -глюкозидаза). Далее проводились исследования по их совместному культивированию. Было показано, что смесь этих линий в соотношении 6:2:1 дает в 1,3 раза больше спирта по сравнению со смесью в равных пропорциях. Данная система была неустойчива в промышленных масштабах при длительном культивировании, но очень удобна в плане изучения оптимизации пропорций ферментов (Baek *et al.*, 2012).

Эффективность работы целлюлозолитических комплексов может зависеть не только от активности отдельных субъединиц, но и от эффективности их синергии. Для проверки предположения о том, что эффективность работы ферментативного комплекса может быть

повышена в результате пространственного сближения активных центров, были проведены исследования, посвященные изучению эффекта иммобилизации белковых молекул на поверхности дрожжевой клетки.

В геном *S. cerevisiae* была клонирована группа генов *A. aculeatus* β -глюкозидазы (BGLI) и *T. reesei* эндоглюканазы II (EGII) с якорным доменом GPI. В результате нарабатываемые ферменты были иммобилизованы на поверхности клетки. Для повышения эффективности работы комплекса была увеличена активность β -глюкозидазы, что привело к увеличению целлюлозолитической активности белкового комплекса в 106 раз по сравнению с коктейлем из свободных ферментов (Matano *et al.*, 2012; Inokuma *et al.*, 2014). В работе Катахира с соавт. был разработан штамм, продуцирующий ксиланазу II (XYNII) из *T. reesei* QM9414 и β -ксилозидазу (XylA) из *Aspergillus oryzae* NiaD300, которые иммобилизовались на поверхности клетки. Основным продуктом при разрушении ксилана была ксилоза, в то время как ди- и трисахариды содержались в очень низкой концентрации (Katahira *et al.*, 2004).

Кроме введения доменов, обладающих ферментативной активностью, была изучена эффективность включения в геном *S. cerevisiae* генов вспомогательных ферментов, участвующих в процессе разложения лигноцеллюлозы. Так в работе Накатани с соавт. в дрожжах были совместно экспрессированы поверхностно закрепленные целлюлазы и “expansin-like proteins”. По сравнению с исходным вариантом, в котором экспрессировались только поверхностно закрепленные целлюлазы, получено увеличение их целлюлазной активности в 2,9 раза и увеличение выхода биоэтанола в 1,4 раза (Nakatani *et al.*, 2013).

Наиболее интересной системой для связывания доменов, участвующих в разрушении лигноцеллюлозной биомассы, в настоящее время является целлюлосома. В работе Гойяла с соавт. (Goyal *et al.*, 2011) разработан консорциум штаммов, продуцирующих ферменты: эндоглюконазу, экзоглюконазу, β -глюкозидазу и скаффолдинг протеин. Полученные ферменты самоорганизовывались в комплекс – миницеллюлосому и закреплялись на клетках дрожжей. Исследования полученного ферментативного

комплекса показали, что организация миницеллюлосомы в три раза увеличивает гидролиз целлюлозы и увеличивает выход спирта. Были проведены исследования по получению гемицеллюлозо-разрушающих миницеллюлосом на поверхности дрожжевых клеток. Для этого разработаны штаммы *S. cerevisiae*, в геном которых был включен ген скаффолдинг протеина, содержащие от одного до трех типов кохезинов, а также были клонированы химерные белки, содержащие соответствующие С-концевые докерины (Sun *et al.*, 2012).

Как для продукции активных ферментов, так и для получения функциональных докеринов необходимо снижение гликозилазной активности синтетического аппарата дрожжей. Был проведен скрининг штаммов, дефицитных по отдельным генам, обеспечивающих гликозилирование в клетках *S. cerevisiae*. Показано, что для некоторых мутантов характерно повышение количества сформированных целлюлосом (Suzuki *et al.*, 2012). Использование дрожжей как потенциальных продуцентов сопряжено с рядом трудностей, но, несмотря на это, исследователи разрабатывают все более эффективные продуценты белковых комплексов, направленных на деградацию растительной биомассы с использованием *S. cerevisiae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

S. cerevisiae является одним из наиболее изученных, с точки зрения молекулярно-генетических механизмов регуляции метаболизма, модельных объектов современной биологии. Дрожжи обладают явным преимуществом по сравнению с другими модельными объектами – наличием функциональных свойств, позволяющих их легко культивировать в условиях суспензионной культуры, несмотря на то что они являются эукариотическими организмами (Geddes *et al.*, 2011). При этом *S. cerevisiae* зарекомендовали себя как устойчивый микроорганизм, способный существовать в жестких условиях технологических процессов (Geddes *et al.*, 2011). Как продуцент этанола *S. cerevisiae* остаются абсолютным лидером по эффективности наработки целевого продукта, что и послужило причиной многочисленных попыток создания на их основе суперпродуцента,

способного к использованию растительной биомассы или сахаров из нее для биосинтеза этанола (Geddes *et al.*, 2011).

В литературе приведены многочисленные примеры экспериментальных подходов, направленных на изменение отдельных свойств дрожжей при помощи модификации их генома, и результатов их применения, примеры этих работ представлены выше. Достаточно продвинулся как методический, так и практический уровень исследований по изменению субстратной специфичности штаммов; получены новые варианты штаммов *S. cerevisiae*, требующие, конечно, дальнейшего развития и оптимизации, но тем не менее способные полноценно ферментировать ксилозу (Ota *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013b). Несмотря на достигнутые результаты в этой области, вопрос о способности модифицированных вариантов штаммов дрожжей к эффективному гидролизу растительной биомассы остается открытым. В ряде работ показано, что принципиально дрожжи могут быть генетически модифицированы для того, чтобы получить способность к ферментации растительной биомассы (Baek *et al.*, 2012). Однако в настоящее время не найдены оптимальные пути, которые позволили бы создать соответствующий штамм для промышленного производства биоэтанола, в том числе. Безусловно, можно утверждать, что это направление будет активно развиваться на основе увеличения масштаба вносимых в геном дрожжей изменений и развития соответствующей теоретической базы для моделирования метаболизма *S. cerevisiae* с учетом вносимых в геном регуляторных модификаций.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта VI.61.1.2.

ЛИТЕРАТУРА

- Ahmed S., Riaz S., Jamil A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview // Applied Microbiology Biotechnology. 2009. V. 84. No. 1. P. 19–35.
- Almeida J.R., Modig T., Petersson A. *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae* // J. Chemical Technology biotechnology. 2007. V. 82. No. 4. P. 340–349.

- Baek S.H., Kim S., Lee K. *et al.* Cellulosic ethanol production by combination of cellulase-displaying yeast cells // *Enzyme Microbial Technology*. 2012. V. 51. No. 6. P. 366–372.
- Bera A., Ho N., Khan A., Sedlak M. A genetic overhaul of *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) to improve xylose fermentation // *J. industrial microbiology biotechnology*. 2011. V. 38. No. 5. P. 617–626.
- Çakar Z., Seker U., Tamerler C. *et al.* Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS yeast research*. 2005. V. 5. No. 6-7. P. 569–578.
- Çakar Z., Turanlı Y., Alkim C., Yılmaz Ü. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties // *FEMS yeast research*. 2012. V. 12. No. 2. P. 171–182.
- Çelik E., Çalık P. Production of recombinant proteins by yeast cells // *Biotechnology advances*. 2012. V. 30. No. 5. P. 1108–1118.
- Chen X., Meng K., Shi P. *et al.* High-level expression of a novel *Penicillium endo-1, 3 (4)-β-d-glucanase* with high specific activity in *Pichia pastoris* // *J. industrial microbiology biotechnology*. 2012. V. 39. No. 6. P. 869–876.
- Cho K.M., Yoo Y.J., Kang H.S. δ-Integration of endo/exo-glucanase and β-glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol // *Enzyme Microbial Technology*. 1999. V. 25. No. 1. P. 23–30.
- De Figueiredo V., de Mello V., Reis V. *et al.* Functional expression of *Burkholderia cenocepacia* xylose isomerase in yeast increases ethanol production from a glucose-xylose blend // *Bioresource Technology*. 2013. V. 128. P. 792–796.
- Deng X., Ho N. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene // *Applied Biochemistry Biotechnology*. 1990. V. 24. No. 1. P. 193–199.
- Fiaux J., Çakar Z.P., Sonderegger M. *et al.* Metabolic-flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* // *Eukaryotic cell*. 2003. V. 2. No. 1. P. 170–180.
- Fujii T., Yu G., Matsushika A. *et al.* Ethanol production from xylo-oligosaccharides by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* expressing β-xylosidase // *Bioscience, biotechnology, biochemistry*. 2011. V. 75. No. 6. P. 1140–1146.
- Geddes C.C., Nieves I.U., Ingram L.O. Advances in ethanol production // *Current opinion biotechnology*. 2011. V. 22. No. 3. P. 312–319.
- Goyal G., Tsai S.L., Madan B. *et al.* Simultaneous cell growth and ethanol production from cellulose by an engineered yeast consortium displaying a functional mini-cellulosome // *Microb. Cell Fact*. 2011. V. 10. P. 89.
- Gurgu L., Lafraya A., Polaina J., Marín-Navarro J. Fermentation of cellobiose to ethanol by industrial *Saccharomyces* strains carrying the β-glucosidase gene (BGL 1) from *Saccharomycopsis fibuligera* // *Bioresource technology*. 2011. V. 102. No. 8. P. 5229–5236.
- Hector R.E., Qureshi N., Hughes S. *et al.* Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption // *Applied microbiology biotechnology*. 2008. V. 80. No. 4. P. 675–684.
- Ilmén M., Den Haan R., Brevnova E. *et al.* High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae* // *Biotechnol Biofuels*. 2011. V. 4. P. 30.
- Inokuma K., Hasunuma T., Kondo A. Efficient yeast cell-surface display of exo-and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter // *Biotechnology biofuels*. 2014. V. 7. No. 1. P. 8.
- Jayaram V., Cuyvers S., Verstrepen K. *et al.* Succinic acid in levels produced by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during fermentation strongly impacts wheat bread dough properties // *Food chemistry*. 2014. V. 151. P. 421–428.
- Karaoglan M., Yildiz H., Inan M. Screening of signal sequences for extracellular production of *Aspergillus niger* xylanase in *Pichia pastoris* // *Biochemical Engineering J*. 2014.
- 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 // *Applied Environmental Microbiology*. 2004. V. 70. No. 9. P. 5407–5414.
- Katahira S., Ito M., Takema H. *et al.* Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1 // *Enzyme Microbial Technology*. 2008. V. 43. No. 2. P. 115–119.
- Khattab S., Saimura M., Kodaki T. Boost in bioethanol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with mutated strictly NADPH-dependent xylose reductase and NADP-dependent xylitol dehydrogenase // *J. biotechnology*. 2013. V. 165. No. 3. P. 153–156.
- Kim S., Skerker J.M., Kang W. *et al.* Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* // *PloS one*. 2013a. V. 8. No. 2. P. e57048.
- Kim S., Lee K., Kong I. *et al.* Construction of an efficient xylose-fermenting diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain through mating of two engineered haploid strains capable of xylose assimilation // *J. Biotechnology*. 2013b. V. 164. No. 1. P. 105–111.
- Kirikyali N., Connerton I.F. Heterologous expression and kinetic characterisation of *Neurospora crassa* β-xylosidase in *Pichia pastoris* // *Enzyme microbial technology*. 2014. V. 57. P. 63–68.
- Kitagawa T., Kohda K., Tokuhiko K. *et al.* Identification of genes that enhance cellulase protein production in yeast // *J. biotechnology*. 2011. V. 151. No. 2. P. 194–203.
- Kötter P., Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* // *Applied microbiology and biotechnology*. 1993. V. 38. No. 6. P. 776–783.
- Kötter P., Amore R., Hollenberg C.P., Ciriacy M. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant // *Current genetics*. 1990. V. 18. No. 6. P. 493–500.
- Kruckeberg A.L. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae* // *Archives microbiology*. 1996. V. 166. No. 5. P. 283–292.

- Kuyper M., Harhangi, H.R., Stave A. *et al.* High level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? // FEMS Yeast Research. 2003. V. 4. No. 1. P. 69–78.
- Kuyper M., Hartog M., Toirkens M. *et al.* Metabolic engineering of a xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation // FEMS Yeast Research. 2005a. V. 5. No. 4-5. P. 399–409.
- Kuyper M., Toirkens M., Diderich J. *et al.* Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain // FEMS Yeast Research. 2005b. V. 5. No. 10. P. 925–934.
- Kuyper M., Winkler A., Dijken J., Pronk J. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle // FEMS yeast research. 2004. V. 4. No. 6. P. 655–664.
- Lee S., Kodaki T., Park Y. *et al.* Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biotechnology. 2012. V. 158.
- Lin Y., Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects // Applied microbiology biotechnology. 2006. V. 69. No. 6. P. 627–642.
- Liu E., Hu Y. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation // Biochemical Engineering J. 2010. V. 48. No. 2. P. 204–210.
- Lu C., Jeffries T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain // Applied environmental microbiology. 2007. V. 73. No. 19. P. 6072–6077.
- Madhavan A., Tamalampudi S., Ushida K. *et al.* Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol // Applied microbiology biotechnology. 2009. V. 82. No. 6. P. 1067–1078.
- Matano Y., Hasunuma T., Kondo A. Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass // Bioresource technology. 2012. V. 108. P. 128–133.
- Matsushika A., Inoue H., Kodaki T., Sawayama S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives // Applied Microbiology Biotechnology. 2009. V. 84. No. 1. P. 37–53.
- Mimitsuka T., Sawai K., Kobayashi K. *et al.* Production of d-lactic acid in a continuous membrane integrated fermentation reactor by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*: Enhancement in d-lactic acid carbon yield // J. bioscience bioengineering. 2014.
- Mormeneo M., Pastor F., Zueco J. Efficient expression of a *Paenibacillus barcinonensis* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* // J. industrial microbiology biotechnology. 2012. V. 39. No. 1. P. 115–123.
- Nakatani Y., Yamada R., Ogino C., Kondo A. Synergetic effect of yeast cell-surface expression of cellulase and expansin-like protein on direct ethanol production from cellulose // Microb. Cell Fact. 2013. V. 12. P. 66.
- Ojeda K., Sánchez E., El-Halwagi M., Kafarov V. Exergy analysis and process integration of bioethanol production from acid pre-treated biomass: comparison of SHF, SSF and SSCF pathways // Chemical Engineering J. 2011. V. 176. P. 195–201.
- Ota M., Sakuragi H., Morisaka H. *et al.* Display of *Clostridium cellulovorans* xylose isomerase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* and its direct application to xylose fermentation // Biotechnology Progress. 2013. V. 29. No. 2. P. 346–351.
- Runquist D., Hahn-Hagerdal B., Radstrom P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // Biotechnol Biofuels. 2010. V. 3. No. 5.
- Runquist D., Fonseca C., Radström P. *et al.* Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* // Applied Microbiology Biotechnology. 2009. V. 82. No. 1. P. 123–130.
- Salusjärvi L., Kaunisto S., Holmström S. *et al.* Overexpression of NADH-dependent fumarate reductase improves D-xylose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // J. industrial microbiology biotechnology. 2013. V. 40. No. 12. P. 1383–1392.
- Sauer U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes // Metabolic Engineering. Springer Berlin Heidelberg, 2001. P. 129–169.
- Sonderegger M., Sauer U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose // Applied and environmental microbiology. 2003. V. 69. No. 4. P. 1990–1998.
- Steen E.J., Chan R., Prasad N. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol // Microb. Cell Fact. 2008. V. 7. No. 1. P. 36.
- Sun J., Wen F., Si T. *et al.* Direct conversion of xylan to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying an engineered mini-hemicellulosome // Applied environmental microbiology. 2012. V. 78. No. 11. P. 3837–3845.
- Suzuki H., Imaeda T., Kitagawa T., Kohda K. Deglycosylation of cellulosomal enzyme enhances cellulosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biotechnology. 2012. V. 157. No. 1. P. 64–70.
- Van Wyk N., Den Haan R., Van Zyl W.H. Heterologous co-production of *Thermobifida fusca* Cel9A with other cellulases in *Saccharomyces cerevisiae* // Applied microbiology biotechnology. 2010. V. 87. No. 5. P. 1813–1820.
- Walfridsson M., Bao X., Anderlund M. *et al.* Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase // Applied environmental microbiology. 1996. V. 62. No. 12. P. 4648–4654.
- Wang P., Schneider H. Growth of yeasts on D-xylulose // Canadian J. microbiology. 1980. V. 26. No. 9. P. 1165–1168.

- Wang T.Y., Huang, C.J., Chen H.L. *et al.* Systematic screening of glycosylation-and trafficking-associated gene knockouts in *Saccharomyces cerevisiae* identifies mutants with improved heterologous exocellulase activity and host secretion // BMC biotechnology. 2013. V. 13. No. 1. P. 71.
- Wilde C., Gold N.D., Bawa N. *et al.* Expression of a library of fungal β -glucosidases in *Saccharomyces cerevisiae* for the development of a biomass fermenting strain // Applied microbiology biotechnology. 2012. V. 95. No. 3. P. 647–659.
- Xu L., Shen Y., Hou J. *et al.* Promotion of Extracellular Activity of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* by Protein Glycosylation Engineering in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr Synthetic Sys Biol. 2014. V. 2. No. 111. P. 2332–0737.1000111.
- Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T. *et al.* Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression // Biotechnol Biofuels. 2011. V. 4. No. 8.
- Young E.M., Tong A., Bui H. *et al.* Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif // Proc. Natl Academy Sciences. 2014. V. 111. No. 1. P. 131–136.
- Yu J., Singh D., Liu N. *et al.* Construction of a Glucose and Xylose Co-Fermenting Industrial *Saccharomyces cerevisiae* by Expression of Codon-Optimized Fungal Xylose Isomerase // J. Biobased Materials Bioenergy. 2011. V. 5. No. 3. P. 357–364.
- Zhou H., Cheng J.S., Wang B.L. *et al.* Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* // Metabolic engineering. 2012. V. 14. No. 6. P. 611–622.

RECOMBINANT STRAINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FOR ETHANOL PRODUCTION FROM PLANT BIOMASS

A.S. Rozanov, A.V. Kotenko, I.R. Akberdin, S.E. Peltek

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: rozanov@bionet.nsc.ru

Symmary

Saccharomyces cerevisiae is the most appropriate and the most widely used model organism for industrial production of ethanol from sugars, because yeasts (1) have high rates of growth, fermentation and biosynthesis of ethanol under anaerobic conditions and (2) are tolerant of high concentrations of ethanol and low pH values. Currently, the most promising source of sugar is lignocellulosic biomass. Sugars derived from it are a mixture of hexoses and pentoses. However, *S. cerevisiae* strains in current use are poorly adapted to pentasaccharide fermentation. Therefore, it is necessary to optimize the metabolism of currently available bioethanol producers for pentasaccharide consumption. The article presents an overview of existing approaches designed to solve this problem by using recombinant *S. cerevisiae* strains.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, lignocellulosic biomass, xylose utilization, bioethanol, producer strain, genetic modification.