УДК 577.21:577.164.1

ВПЛИВ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ ZNF1 ТА SIP4 НА АЛКОГОЛЬНУ ФЕРМЕНТАЦІЮ КСИЛОЗИ У РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Л.С. ДЗАНАЄВА [1], Ю. РУХАЛА [2], А.А. СИБІРНИЙ [1, 2], К.В. ДМИТРУК [1,*]

[1] Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова 14/16, м. Львів, 79005, Україна
[2] Жешівський університет, вул. Зельверовича 4, Жешів 35-601, Польща

* E-mail: dmytruk77@gmail.com

Упродовж останніх років збільшився попит на технічний етанол за рахунок його використання у транспортному секторі. Ксилоза є основним п'ятивуглецевим цукром отриманим у результаті гідролізу лігноцелюлози, проте промисловий продуцент спирту дріжджі Saccharomyces cerevisiae ферментують виключно гексози. На основі рекомбінантного штаму, здатного до метаболізму ксилози, сконструйовано похідні з посиленою експресією гена ZNF1 та делецією гена SIP4, що кодують транскрипційні фактори. Встановлено, що посилення експресії гена ZNF1 не впливало на зброджування як глюкози, так і ксилози. Делеція гена SIP4 не впливала на ферментацію глюкози, однак призводила до зниження продукції етанолу на 29 % при ферментації ксилози у порівнянні з вихідним штамом.

Ключові слова: транскрипційні фактори, *S. cerevisiae,* експресія генів, ксилоза, алкогольна ферментація.

Вступ. Рослинна біомаса – найбільш поширений поновлювальний ресурс на планеті, що розглядається як альтернатива продуктам нафтопереробки. Продукт її біотехнологічної конверсії – етанол використовується як додаток до бензино-етанольних сумішей або у чистому вигляді в спеціалізованих двигунах. Викиди двигунів внутрішнього згорання це небезпечні антропогенні забруднювачі, які викликають зміни в екосистемах, а емісія CO_2 загострює парниковий ефект, тому з екологічних міркувань спалювання етанолу має переваги. Аналітичні розрахунки вказують, що чистий етанол має кращі антидетонаційні властивості, тому можливе його використання у потужних силових установках із високим ступенем стиснення, підвищивши к.к.д. [1]. На сьогодні, практично весь етанол отримується шляхом мікробної ферментації за участі спиртових дріжджів *S. cerevisiae* з традиційної сировини, якою є гідролізати крохмалю та цукор (сахароза), одержані шляхом переробки харчових культур.

Виробництво етанолу з нехарчової сировини – целюлозовмісних відходів сільського господарства та деревообробної промисловості є ускладнене комплексністю лігноцелюлозної структури. До її складу входять три основні компоненти: полімери цукрів целюлоза 45 % та геміцелюлоза 30 %, і ароматичний гетерополімер лігнін 25 %. Ферментація лігноцелюлози здійснюється у декілька технологічних етапів, які включають попередню обробку, гідроліз та ферментацію. Ксилоза є основним п'ятивуглецевим цукром отриманим у результаті гідролізу, та другим за кількістю моносахаридом після глюкози. Деякі організми володіють природною здатністю до її ферментації, проте рівень синтезу етанолу дуже низький [2]. До того ж всі вони значно поступаються *Saccharomyces cerevisiae* за стійкістю до екстремальних, промислових умов ферментації. Проте більшість штамів дріжджів *S. cerevisiae* не здатні не тільки ферментувати, але й рости на середовищі з ксилозою.

З метою конструювання ксилозо-утилізуючих штамів у геном *S. cerevisiae* було введено гени, які кодують ферменти перетворення ксилози до ксилулозо-5-фосфату. У дикий штам *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D введено центромерну плазміду pRS314-X123 для посилення експресії генів *XYL1*; *XYL2*, що кодують ферменти ксилозоредуктазу та ксилітолдегідрогеназу, а також *XYL3*, що кодує ксилулокіназу, три гени отримані з природного ферментатора ксилози, дріжджів *Scheffersomyces stipitis.* Наступний етап роботи передбачав декілька повторюваних

© Л.С. ДЗАНАЄВА, Ю. РУХАЛА, А.А. СИБІРНИЙ, К.В. ДМИТРУК, 2020

циклів культивування з періодичним переносом культури у мінеральне середовище, що містило ксилозу. Ізольований штам GS010 характеризувався швидким ростом на ксилозі та швидким споживанням цього субстрату [3]. Даний штам був використаний у нашій роботі як вихідний.

Незважаючи на інтенсивну роботу направлену на інженерію штамів *S. cerevisiae* вихід етанолу з ксилози все ще залишається нижчим, ніж для глюкози. Тому виявлення нових механізмів регуляції зброджування чужорідного субстрату ксилози до етанолу у рекомбінантних дріжджів, які можуть бути мішенями для поліпшення характеристик алкогольної ферментації цієї пентози є актуальним завданням.

У *S. cerevisiae* виявлено 200 транскрипційних факторів, із них 55 містять специфічний для грибів мотив кластера цинку (Zn_2 Cys_6), та беруть участь у складних і добре регульованих метаболічних шляхах [4]. Транскрипційний фактор Znf1 *S. cerevisiae* належить до родини транскрипційних активаторів цинкового кластеру. Znf1 зв'язується з промоторами генів, продукти яких беруть участь у клітинному диханні, глюконеогенезі, циклі трикарбонових кислот та гліоксилатному шунті. Цей транскрипційний фактор необхідний для підтримання нормальної морфології та функціонуванні мітохондрій при рості на дихальних субстратах, а також залучений у відповідь на осмотичний стрес, та стрес спричинений відхиленням від нейтрального значення pH [5]. Транскрипційний фактор Sip4 *S. cerevisiae* також належить до родини транскрипційних активаторів цинкового кластеру. Sip4 активує транскрипцію генів глюконеогенезу шляхом взаємодії з відповідними промоторами. Експресія *SIP4* активується після вичерпання глюкози в середовищі, як це властиво генам глюконеогенезу [6]. Sip4 є субстратом протеїнкінази Snf1, яка функціонує у комплексі з допоміжними білками Snf4, Sip1, Sip2 та Gal83. Проте штам *sip4Δ* (навіть з додатковими делеціями *sip1Δ sip2Δ sip3Δ*) не відзначався фенотиповими змінами, це наштовхує на думку про існування функціонального гомолога *SIP4* [7].

Рекомбінантні дріжджі *S. cerevisiae* катаболізують ксилозу після її перетворення до ксилулозо-5-фосфату через пентозофосфатний шлях. У пентозофосфатному шляху синтезуються фруктозо-6-фосфат та гліцеральдегід-3-фосфат які можуть брати участь у синтезі глюкози через глюконеогенез. При ферментації ксилози рекомбінантним штамом *S. cerevisiae* відбувається активація гліоксилатного шунту [3], що свідчить про активацію дихального метаболізму. Транскрипційні фактори Znf1 та Sip4 залучені в регуляцію глюконеогенезу та метаболізм дихальних субстратів та можуть мати потенційний вплив на катаболізм ксилози. Вплив цих транскрипційних факторів на алкогольну ферментацію ксилози рекомбінантними штамами *S. cerevisiae* не досліджувався. У даній роботі описано конструювання та біохімічну характеристику рекомбінантних штамів з посиленою експресією гена *ZNF1*, та делецією гена *SIP4* на основі ксилозо-ферментуючого штаму *S. cerevisiae*.

Матеріали і методи. Штами і умови культивування. У роботі використовували штами дріжджів *S. cerevisiae* S288C і штам *S. cerevisiae* CMB.GS010 (GS010) [3]. Дріжджі вирощували на багатому середовищі YPD (10 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л пептон, 20 г/л глюкоза); YPX (1 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л пептон, 20 г/л ксилоза); або на мінеральному середовищі (YNB – 1,7 г/л; $(NH_4)_2SO_2$ – 5 г/л ксилоза – 20 г/л). Бактерійний штам *E. coli* DH5α (Φ80d*lac*ZΔM15, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17(r^-_K m^+_K), *supE*44, *relA*1, *deoR*, *Δ*(*lacZYA-argF*)U169) вирощували при 37 °C на багатому середовищі LB (5 г/л дріжджовий екстракт, 15 г/л пептон, 10 г/л NaCl) [8]. Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 0,1 мг/л. Для проведення алкогольної ферментації глюкози і ксилози дріжджову біомасу нарощували на повному середовищі YPD/YPX (10 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л пептон, 20 г/л глюкоза/ксилоза) упродовж однієї доби на орбітальному шейкері (200 об./хв) при температурі 30 °C. Клітини осаджували центрифугуванням та промивали водою. Біомасу переносили в мінеральне середовище YNB з додаванням 80 г/л глюкози (0,5 мг/мл клітин) або 40 г/л ксилози (1 г/л клітин). Алкогольну ферментацію проводили на орбітальному шейкері при температурі 30 °C

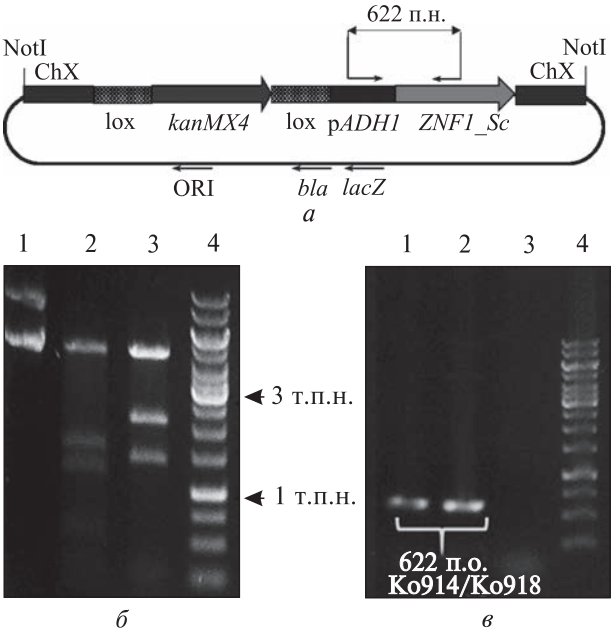

Рис. 1. Кільцева схема плазміди pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1. *kanMX4* – ген, що забезпечує резистентність до генетицину позначено чорною стрілкою; Lox послідовності позначені смугами з крапками; ВРТ *ZNF1* з власним термінатором під контролем промотора гена *ADH1* позначені сірою стрілкою та чорною смугою відповідно; ChX – нейтральний локус на хромосомі X для інтеграції позначений чорною смугою; бактерійна частина, що містить ген резистентності до ампіциліну (*bla*) і ORI – послідовність показані тонкими стрілками (*а*); електрофореграма рестрикційного аналізу вектору; 1. pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1 нативна форма; 2. pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1/NcoI/PstI (4541 п.н., 1575 п.н., 1236 п.н., 561 п.н., 275 п.н., 173 п.н.); 3. pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1/PstI (4541 п.н., 2136 п.н., 1409 п.н., 275 п.н.); 4. маркер молекулярної маси фрагментів (*б*); електрофореграма ПЛР-аналізу трансформантів штаму GS010/ZNF1 з використанням пари праймерів Ko914/Ko918 (1, 2 – трансформанти GS010/ZNF1; 3 – негативний контроль (хромосомна ДНК GS010); 4 – маркер молекулярної маси фрагментів (*в*)

за умов обмеженої аерації (100 об./хв) упродовж 3 діб. Оптичну густину суспензії клітин дріжджів та бактерій вимірювали за допомогою спектрофотометра Helios gamma (OD, 600 нм; кювета, 10 мм) з гравіметричним калібруванням. Концентрації аналітів в середовищі визначалися методом HPLC (PerkinElmer, Series 2000, USA) з Aminex HPX-87H іонообмінною колонкою (Bio-Rad, Hercules, USA). Швидкість потоку рухомої фази (4 мМ H_2SO_4) становила 0,6 мл/хв; температура колонки 35 °С.

Молекулярно-генетичні методи. У роботі були використані стандартні молекулярно-генетичні методи [8]. Очистку ДНК проводили на колонках фірми «Quiagen» (Quiagen PCR Purification Kit). При ампліфікації фрагментів ДНК використовували синтетичні олігонуклеотидні праймери фірм «IDT Technologies» або «Sigma» (США). Визначення нуклеотидної послідовності фрагментів ДНК проводили на фірмі «Biocentrium» та «Genomed». Трансформацію дріжджів *S. cerevisiae* проводили хімічним методом з використанням ацетату літію [9]. Для селекції дріжджових трансформантів YPX середовище містило 0,2 г/л генетицину. Кількісну ПЛР (ПЛР у реальному часі) проводили на приладі Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System з використанням набору Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix «Thermo scientific» згідно інструкцій виробника. 100 нг РНК було використано в 20 мкл реакційної суміші, що містить 1 мкМ кожного праймера. Використовували наступні параметри ампліфікації: 20 с при 50 °С та 10 хв при 95 °С підготовка, 40 циклів 10 с при 95 °С та 1 хв при 60 °С. Кратну зміну амплікона в дослідному зразку у порівнянні з контрольним зразком вимірювали в двох повторах, що були нормовані за контрольним геном *ACT1* і розраховували з використанням порівняльного методу Ct (ΔΔCt).

Конструювання штамів. ВРТ *ZNF1* з власним термінатором, розміром 1700 п.н. було ампліфіковано з використанням пари праймерів Ko916/Ko917 з геномної ДНК *S. cerevisiae* S288C. Ампліфікований фрагмент було оброблено ендонуклеазою рестрикції NdeI і клоновано в NdeI-лінеаризований та дефосфорильований вектор pX-2-Lox-KanMX-pADH1 [10]. В результаті сконструйовано вектор для посилення експресії гена *ZNF1* що отримав назву pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1 (рис. 1, *а*). Підтвердження коректності сконструйованого вектора було здійснено за допомогою рестрикційного аналізу (рис. 1, *б*). Плазміду pX-2-Lox-KanMX-pADH1-ZNF1 було оброблено NotI та трансформовано в клітини ксилозо-ферментуючого штаму GS010. Наявність цільової ка-

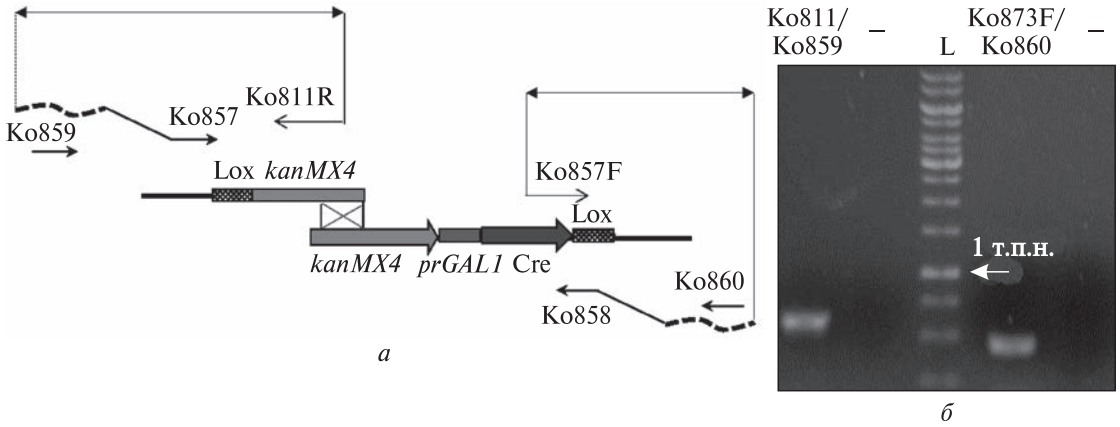

Рис. 2. Схема двокомпонентної системи для делеції гена *SIP4 S. cerevisiae*; Lox послідовності позначені смугами з крапками; Cre рекомбіназа під контролем промотора гена *GAL1* позначені темно-сірою стрілкою та сірою смугою відповідно (*а*); електрофореграма ПЛР продуктів з використанням пар праймерів Ko811R/Ko859 та Ko873F/Ko860 і геномної ДНК штаму GS010/sip4Δ як матриці для підтвердження коректності делеції гена *SIP4*; негативний контроль (хромосомна ДНК штаму GS010) позначений як «–»; L – маркер молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подано в т.п.н.) (*б*)

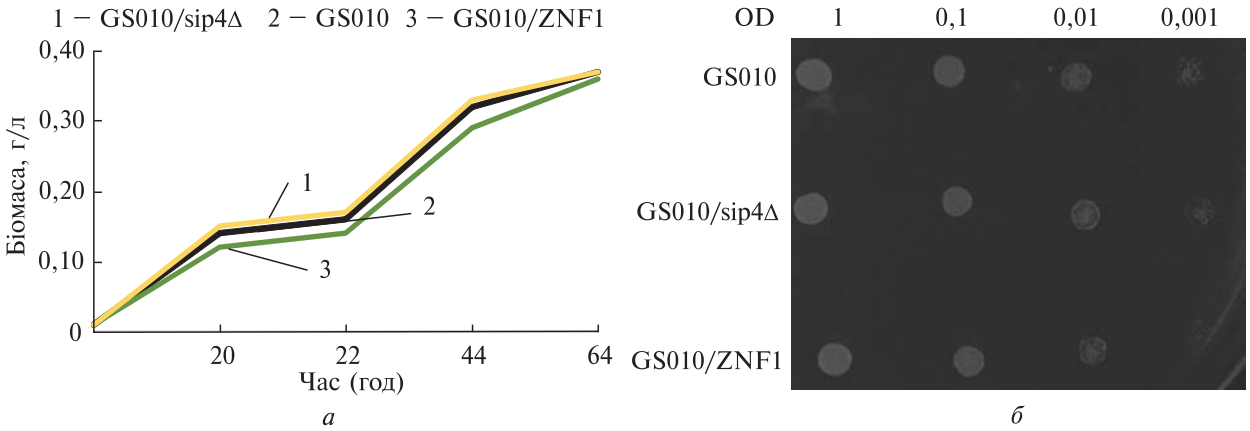

Рис. 3. Кінетика нагромадження біомаси штамами *S. cerevisiae* GS010; GS010/sip4Δ та GS010/ZNF1 під час аеробного культивування (200 об/хв) на середовищі YNB із додаванням ксилози (2 %), початкова біомаса 0,009 г/л (OD 0,03 λ600) при 30 °C (*а*); крапельний ростовий тест на агаризованому мінеральному середовищі з 1 % ксилозою як джерелом вуглецю (*б*)

сети експресії в геномі трансформантів було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ko914/Ko918 (рис. 1, *в*).

Для делеції гена *SIP4* використано двокомпонентну систему на основі двох фрагментів, які рекомбінують in vivo і формують функціональний ген *kanMX4*, що забезпечує селекцію трансформантів на середовищі з генетицином. Перший фрагмент містив 50 нуклеотидів після старт-кодону ВРТ *SIP4* та частину маркера *kanMX4*. Цей фрагмент ампліфіковано з касети 1 [11] за допомогою пари праймерів Ko857/Ko808 (Послідовності всіх праймерів представлені в табл. 1). Другий фрагмент містив частину маркера *kanMX4*, ген Cre, що кодує рекомбіназу під контролем промотора *S. cerevisiae GAL1* та 50 нуклеотидів перед стоп-кодоном ВРТ *SIP4*, ампліфіковано з касети 2 [11] з використанням пари праймерів Ko858/Ko809 (рис. 2, *а*). Обидва фрагменти були ко-трансформовані у штам GS010. Пошук штамів, в яких відбулася гомологічна рекомбінація 5′- та 3′-кодуючих ді-

лянок гена *SIP4* довжиною 50 нуклеотидів у складі ПЛР-фрагментів з відповідними локусами хромосомної ДНК реципієнта та заміщення гена *SIP4* на маркерний ген *kanMX4*, проводився за допомогою ПЛР. Було використано праймери, гомологічні ділянкам ДНК,

Таблиця 1. **Перелік праймерів використаних у роботі**

Назва праймера	Послідовність праймера 5′-3′
Ko857	ATG GCC AAG AGG AAA TAT GGC AGG TCT TAT TCC CTC GAT GAT ACA GAT TCG ACA ACC CTT AAT TAC CGT TC
Ko808	CAA CCT ATT AAT TTC CCC TCG TCA AAA ATA AGG TTA TCA AGT GAG AAA TCA CCA TGA G
Ko858	TTA GAA GGT CGA GTT CAA AAT ATT CTG GAT CTT GAA TTT TTG TTT ACT GGG GAT CTG ATA TAC CGT TCG TAT AGC ATA C
Ko 809	GGC AAA ACA GCA TTC CAG GTA TTA GAA GAA TAT CCT GAT TCA GGT GAA AAT ATT G
Ko859	CTT TTT TTC TTC TCG CTA CTC TG
Ko811R	CCC ATA TAA ATC AGC ATC CAT G
Ko873F	CTG CTG GAA GAT GGC GAT TAG
Ko860	CTG AAT GAG TAA TAC GAA GGA G
Ko916	GGG AAT TCC ATA TGG CCC GCA ATA GAC AAG CG
Ko917	GGG AAT TCC ATA TGT ATA ACC AAG TAC AAA TCG CAC GAC
Ko914	ATC ATC ATA TCG AAG TTT CAC TAC
Ko918	ACG GGT TTT GGA CCT CTT TTC
ADH1F	CAA GTG TTG TTC TGA TGT CTT C
ADH1R	ATT TGA CCC TTT TCC ATC TTT TC
TKL1F	CAA CGT TCC AAT CAT GTC TG
TKL1R	TTT GAG CTC TTT CAG CAA CAC
TAL1F	TCA AAA ACT TGG CTG GTG TTG
TAL1R	CAG AGA ATT TTC TGA TAC CTT C
RKI1F	AAG TTG ACA TCA GAC AAG GAG
RKI1R	TAC CGA AGT AGG CTT TTG AAG
RPE1F	ATG GCT CTT GTT ATG ACT GTG
RPE1R	TAC CAG CGA CAA TAA CGT TG
ACO1F	AAA AAA CAA GGT CTA TTG CCA TTG
ACO1R	GCT CAT CGT TGA AAG TAT GG
FUM1F	TAT CAA AGC CAA TGA GCC TC
FUM1R	AAA TTC CTT TTC AGT CAA TAC ACC
CIT1F	TGT TGA TTC ACA TTC CGG TG
CIT1R	ATT TTT CGG TGG AGA ATG ATT TTG
MDH1F	AGG CAT CGA ATT CTT TGC ATC
MDH1R	TCT TCA AGG TTT CTT TAC ATT TTT G
PYC1F	TGA TCC ATT ACA CAT TGG TGC
PYC1R	GTC CAC ATT TTC ACC ATC AGA
FBP1F	AGA GCC CCA ACG GAA AAC
FBP1R	ATT TCA CCT GAA GAA CCC AAC
PCK1F	CAT TCT GGA TTC TAT TCA TGA TG
PCK1R	GAA ATT TTG AAC AAA CAA GTT GGC
MAE1F	TAT CGA GCA AGA ACA AGT ACC
MAE1R	CTT GAT CAT AGG TCT GTA CAC
ICL1F	TAC ACA CTA ACG CTT TAG CTG
ICL1R	GCT AAC TTC AAT AAC CCA TCG
PDC1F	CTA TCC TTG TTG CCA ACT TTC
PDC1R	ATC GAA GAC TGG CAA CAT AAC

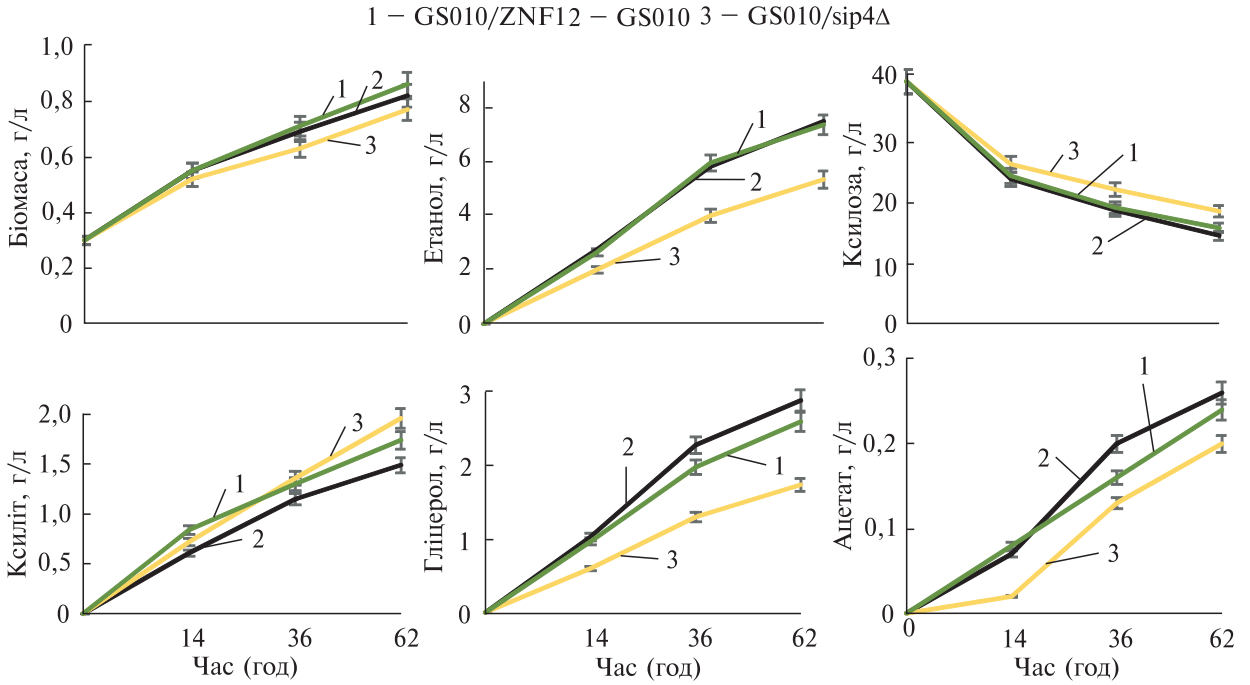

Рис. 4. Кінетика нагромадження біомаси, продукції етанолу, ксиліту, гліцеролу, ацетату, та споживання ксилози штамами *S. cerevisiae* GS010; GS010/sip4Δ та GS010/ZNF1 протягом ферментації ксилози

поза межами 5′- та 3′-кодуючих фрагментів гена *SIP4* та праймери, комплементарні послідовності гена *kanMX4* та Cre рекомбінази (Ko859/Ko811R та Ko873F/Ko860). В результаті ПЛР-скринінгу було відібрано *sip4*Δ штам, з хромосомної ДНК якого, було ампліфіковано фрагменти очікуваної величини (рис. 2, *б*), що слугувало доказом заміщення гена *SIP4* на ген *kanMX4*.

Результати та обговорення. Штами з посиленою експресією гена *ZNF1* (GS010/*ZNF1*) та делецією гена *SIP4* (GS010/sip4Δ), сконструйовані на основі ксилозо-ферментуючого штаму GS010, було використано для аналізу ферментативної активності та визначення експресії ключових генів циклу трикарбонових кислот, гліоксилатного шунту, глюконеогенезу, пентозофосфатного шляху та генів, продукти яких беруть участь у заключному етапі продукції етанолу.

Штам GS010/*ZNF1* характеризувався незначним зниженням нагромадження біомаси як при аеробному культивуванні на ксилозі так і за результатами крапельного ростового тесту на цьому ж вуглецевому субстраті, при порівнянні з вихідним штамом (рис. 3). Однак за умов алкогольної ферментації, відмінності у накопиченні біомаси між штамами GS010/

Таблиця 2. **Основні параметри ферментації ксилози штамами *S. cerevisiae* GS010; GS010/sip4Δ та GS010/*ZNF1* за умов обмеженої аерації при 30 °C**

Штам	Етанол, г/л*	Вихід етанолу (г/г спожитої ксилози)*	Рівень продукції етанолу (г/г біомаси/год)**	Продуктивність синтезу етанолу (г/л/год)**
GS010	7,48 ± 0,17	0,294 ± 0,004	0,357 ± 0,008	0,196 ± 0,005
GS010/sip4Δ	5,34 ± 0,18	0,250 ± 0,005	0,274 ± 0,009	0,142 ± 0,006
GS010/ZNF1	7,36 ± 0,17	0,305 ± 0,004	0,344 ± 0,008	0,189 ± 0,005

Примітка: * – дані представлені на 62 год ферментації; ** 14 год ферментації.

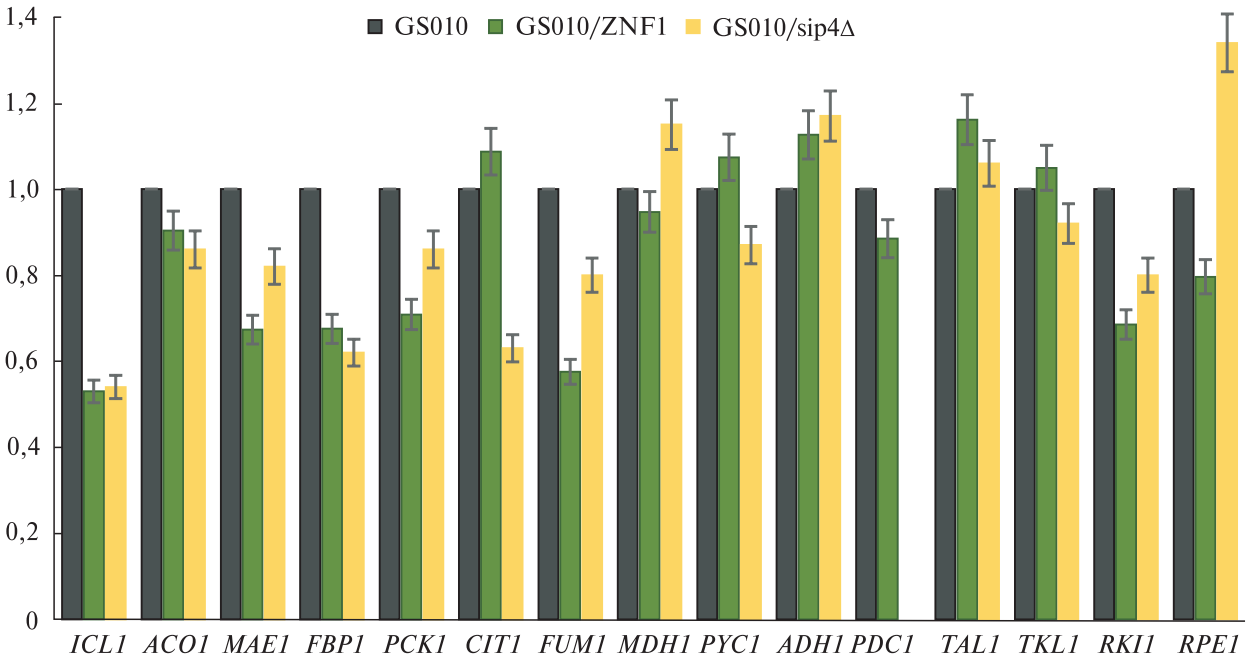

Рис. 5. Кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі (qRT-PCR) штамів *S. cerevisiae* GS010; GS010/sip4Δ та GS010/ZNF1 в умовах ферментації ксилози на 36 год: *ICL1* – ізоцитрат ліаза; *ACO1* – аконітаза; *MAE1* – малатдекарбоксилаза; *FBP1* – фруктозо1,6-бісфосфатаза; *PCK1* – фосфоенолпіруват карбоксикіназа; *CIT1* – цитрат синтаза; *FUM1* – фумараза; *MDH1* – малатдегідрогеназа; *PYC1* – піруваткарбоксилаза; *ADH1* – алкоголь-дегідрогеназа; *PDC1* – піруватдекарбоксилаза; *TAL1* – трансальдолаза; *TKL1* – транскетолаза; *RKI1* – рибозо-5-фосфат ізомераза; *RPE1* – рибулозо-5-фосфат епімераза

ZNF1 та GS010 не спостерігалось (рис. 4). Найвищий вихід етанолу з ксилози спостерігали на третю добу ферментації. Продукція етанолу з ксилози на 62 год ферментації не відрізнялась від продукції етанолу батьківським штамом і становила 7,36 г/л (рис. 4; табл. 2). Продукція ксиліту зростала на 17 %, а гліцерину та ацетату знижувалась на 15 % при порівнянні з вихідним штамом (рис. 4). Відмінності у продукції етанолу при ферментації глюкози між штамами GS010 та GS010/*ZNF1* не спостерігалось. Рівень експресії генів штаму GS010/*ZNF1* визначали за допомогою кількісного ПЛР-аналізу за умов ферментації ксилози. За результатами аналізу qRT-PCR штам GS010/*ZNF1* характеризувався зниженою транскрипцією генів *ICL1* (в 1,48 раза); *FUM1* (в 1,43 раза); *FBP1* (в 1,33 раза); *MAE1* (в 1,33 раза); *RKI1* (в 1,32 раза); *PCK1* (в 1,3 раза) та *RPI1* (в 1,21 раза). Незначне відхилення від контролю зафіксовано у *TAL1* (в 1,16 раза); *ACO1* (в 1,1 раза); *CIT1* (в 1,1 раза); *PDC1* (в 1,12 раза) та *ADH1* (в 1,12 раза) (рис. 5). Посилення експресії *ZNF1* хоч і мало негативний вплив на транскрипцію ряду генів, проте це не знижувало продукцію етанолу з ксилози.

Штам *sip4Δ* на відміну від GS010/*ZNF1* характеризувався на 6 % зниженим накопиченням біомаси при ферментації ксилози (рис. 4), тоді як при аеробному культивуванні чи культивуванні на чашках, відмінностей у рості між *sip4Δ* та GS010 не спостерігалось (рис. 3). Встановлено, що продукція етанолу при ферментації ксилози штамом *sip4*Δ була знижена на 29 % у порівнянні з батьківським штамом і становила 5,34 г/л (рис. 4; табл. 2). Продукція гліцерину та ацетату була знижена на 40 та 23 %, відповідно, тоді як продукція ксиліту зростала на 24 % (рис. 4). Делеція гена *SIP4* не мала впливу на продукцію етанолу та накопичення біомаси при алкогольній ферментації глюкози. За результатами кількісного ПЛР аналізу в реальному часі встановлено, що найбільшим зниженням транскрипції відзначились гени

ICL1 (в 1,46 раза); *FBP1* (в 1,38 раза) та *CIT1* (в 1,37 раза). Підвищення транскрипції виявлено для гена *RPE1* (в 1,34 раза). Відхилення в експресії інших генів були незначними: *FUM1* (в 1,2 раза); *RKI1* (в 1,2 раза); *MAE1* (в 1,18 раза); *ADH1* (в 1,17 раза); *MDH1* (в 1,15 раза); *PCK1* (в 1,14 раза); *ACO1* (в 1,14 раза); *PYC1* (в 1,13 раза) (рис. 5). Отже, транскрипційний активатор Sip4 бере участь у регуляції алкогольної ферментації ксилози у *S. cerevisiae*. Відсутність цього білка негативно позначилась на рівні експресії деяких генів ЦТК, глюконеогенезу та гліоксилатного циклу. Отримані результати добре узгоджуються із зниженням продукції етанолу при алкогольній ферментації ксилози.

Висновок. У результаті проведеної роботи було сконструйовано рекомбінантні штами *S. cerevisiae* з посиленою експресією гена *ZNF1*, та делецією гена *SIP4* на основі ксилозо-ферментуючого штаму *S. cerevisiae*. Встановлено, що штам з посиленою експресією гена *ZNF1* за продукцією етанолу не відрізнявся від вихідного штаму при ферментації як ксилози так і глюкози. Проте, вихід етанолу з ксилози штамом *sip4*Δ був знижений на 29 % у порівнянні з батьківським штамом і становив 5,34 г/л.

Дотримання етичних стандартів. Ця робота виконана з дотриманням етичних вимог кожним із авторів та не передбачає досліджень, у які залучено тварин або людей.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу виконано за часткової фінансової підтримки польського гранту Національного наукового центру (NCN) DEC-2012/05/B/NZ1/01657.

THE IMPACT OF TRANSCRIPTIONAL FACTORS ZNF1 AND SIP4 ON XYLOSE ALCOHOLIC FERMENTATION IN RECOMBINANT STRAINS OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

L.S. Dzanajewa, J. Ruchala, A.A. Sibirny, K.V. Dmytruk

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv 79005, Ukraine
University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, Rzeszow 35-601, Poland

*E-mail: dmytruk77@gmail.com

In recent years the demand for technical ethanol has increased due to its use in the transportation sector. Xylose is the major five-carbon sugar obtained as a result of lignocellulose hydrolysis, however, an industrial producer of alcohol − *S. cerevisiae* yeast − ferments exclusively hexoses. Based on a recombinant strain capable of xylose metabolism, the derivatives with increased expression of the *ZNF1* gene and deletion of the *SIP4* gene, encoding transcription factors, were constructed. It was found that overexpression of *ZNF1* gene did not affect the fermentation of glucose or xylose. The deletion of the *SIP4* gene did not affect the fermentation of glucose, but resulted in a 29 % decrease in ethanol production during xylose fermentation as compared to the parental strain.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ ZNF1 И SIP4 НА АЛКОГОЛЬНУЮ ФЕРМЕНТАЦИЮ КСИЛОЗЫ У РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Л.С. Дзанаева, Ю. Рухала, А.А. Сибирный, К.В. Дмитрук

В последние годы увеличился спрос на технический этанол за счет его использования в транспортном секторе. Ксилоза является основным пятиуглеродным сахаром полученным в результате гидролиза лигноцеллюлозы, однако промышленный продуцент спирта дрожжи *S. cerevisiae* ферментируют только гексозы. На основе рекомбинантного штамма, способного к метаболизму ксилозы, сконструированы производные с усиленной экспрессией гена *ZNF1* и делецией гена *SIP4*, кодирующих транскрипционные факторы. Установлено, что усиление экспрессии гена *ZNF1* не влияло на сбраживания как глюкозы, так и ксилозы. Делеция гена *SIP4* не влияла на ферментацию глюкозы, однако приводила к снижению продукции этанола на 29 % при ферментации ксилозы по сравнению с исходным штаммом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dias, De Oliveira, M.E., Burton, E., Vaughan, B.E., and Rykiel, E.J., Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. *BioScience*. 2005, vol, 55, no. 7, pp. 593−602. https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0593:EAFECD]2.0.CO;2
2. Sybirnyi, A., Bio-fuel ethanol of lignocellulose (vegetable biomass): achievments, problems, prospects. *Visnyk NAN Ukraine*. 2006, no. 3. ISSN 0372-6436.
3. Scalcinati, G., Otero, J.M., Van, Vleet, J.R., Jeffries, T.W., Olsson, L., and Nielsen, J., Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient

aerobic xylose consumption. *FEMS Yeast Research*. 2012, vol. 12, no. 5, pp. 582–97. https://doi.org/10.1111/j.15671364.2012.00808.x.
4. MacPherson, S., Larochelle, M., and Turcotte, B., A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster croteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2006, vol. 70, no. 3, pp. 583–604. https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-06.
5. Tangsombatvichit, P., Semkiv, M.V., Sibirny, A.A., Jensen, L.T., Ratanakhanokchai, K., and Soontorngun, N., Zinc cluster protein Znf1, a novel transcription factor of non-fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2015, vol. 15, no. 2, pii: fou002. https://doi.org/10.1093/femsyr/fou002.
6. Vincent, O., Carlson, M., Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J*. 1998, vol. 17, no. 23, pp. 7002–8. https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.7002.
7. Gancedo, J.M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 1998, vol. 62, no. 2, pp. 334–61.
8. Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T., *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
9. Gietz, R.D., Woods, R.A., Transformation of yeast by lithium acetate/single stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*. 2002, vol. 350, pp. 87–96. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5.
10. Ferreira, R., Teixeira, P.G., Gossing, M., David, F., Siewers, V., and Nielsen, J., Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for overproduction of triacylglycerols. *Metab. Engin. Commun*. 2018, vol. 6, pp. 22–7. https://doi.org/10.1016/j.meteno.2018.01.002.
11. Wenning, L., Yu, T., David, F., Nielsen, J., and Siewers, V., Establishing very long-chain fatty alcohol and wax ester biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol.Bioengin*. 2017, vol. 114, no. 5, pp. 1025–35. https://doi.org/10.1002/bit.26220.

Надійшла в редакцію 10.03.20
Після доопрацювання 24.03.20
Прийнята до друку 18.09.20