

АДАПТИВНА ЕВОЛЮЦІЯ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКЦІЇ ЕТАНОЛУ ПІД ЧАС СПИРТОВОГО БРОДІННЯ У ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

А. ЗАЗУЛЯ, М. СЕМКІВ, К. ДМИТРУК, А. СИБІРНИЙ

Інститут біології клітини, Національна Академія Наук України
вул. Драгоманова 14/16, 79005 Львів, Україна;
E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

*Етанол — одна із найважливіших сполук, що широко використовується у медицині, фармакології, харчовій та паливній промисловості, косметології та інших галузях. Основним способом виробництва етанолу є бродіння з використанням пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* перетворюють глюкозу до етанолу дуже ефективно: вихід етанолу становить більш ніж 90 % від теоретичного максимуму. Однак навіть незначне підвищення виходу етанолу в процесі алкогольної ферментації в промислових масштабах може забезпечувати продукцію додаткових сотень мільйонів тон етанолу щороку. В даній роботі для підвищення продукції етанолу у промислових штамів *S. cerevisiae* ми застосували метод адаптивної еволюції: тривалого культивування в середовищі з високими концентраціями глюкози та етанолу. Більшість з отриманих адаптованих штамів характеризувалися підвищеною продукцією етанолу під час спиртового бродіння в порівнянні з вихідними штамми.*

Ключові слова: етанол, спиртове бродіння, *Saccharomyces cerevisiae*, адаптивна еволюція.

Вступ. Етанол має надзвичайно широкий спектр застосувань. Серед найбільш значущих: виробництво палива, спиртних напоїв, використання етанолу як розчинника, антисептика, та ін. Світова продукція етанолу зростала протягом останніх десятиліть, досягнувши 97 мільярдів літрів в 2015 р. [1].

Етанол може замінити бензин як пальне в двигунах Отто. Генрі Форд використав етанол в одному з перших його автомобілів в 1880 р. Незважаючи на вибір Форда, в подальшому нафта стала переважаючим первинним джерелом для виробництва пального за рахунок її відносної дешевизни та легкості переробки. До теперішнього часу, мінеральне пальне доміну-

вало на світовому ринку палива; однак позиція виробників почала змінюватися після світової нафтової кризи в 1973 р., під час якої були запуснені масштабні програми виробництва паливного етанолу, наприклад PROALCOOL в Бразилії [2]. Незважаючи на нестабільність цін і ненадійне постачання нафти для виробництва мінерального пального, більшість країн продовжують покладатися на викопні ресурси для виробництва палива. Це зумовило все більше зацікавлення в етанолі як альтернативному паливі. На сьогодні, продукція етанолу розглядається як одна з можливих альтернатив викопному паливу, що могла б забезпечити часткове заміщення бензинового пального. Більше того, виробництво етанолу може сприяти зниженню викиду вуглекислого газу в атмосферу — фактору, що загострює парниковий ефект і є основною причиною кліматичних змін. Спалювання відновлюваного пального в автомобільних двигунах вивільняє лише таку кількість вуглекислого газу, яка була попередньо поглинута рослинами, таким чином знижуючи загальну емісію CO₂. Таким чином, зацікавлення в альтернативних джерелах пального постійно зростає протягом останніх десятиліть. Етанол може бути змішаний з бензином у різних співвідношеннях. Суміші, що на сьогодні використовуються в Європі, мають низький вміст етанолу — до 10 %. Частка альтернативного пального в сумішах зростатиме протягом наступних років завдяки ініціативам по збільшенню виробництва біопалива, що форсуються урядами країн по всьому світу. На сьогодні, найбільше паливного етанолу продукується в Бразилії і США [3].

Традиційно, паливний етанол продукувався з допомогою спиртового бродіння з використанням переважно пекарських дріжджів *Saccha-*

romyces cerevisiae з цукро- або крохмалевмісної сировини, такої як цукрова тростина, цукровий буряк, кукурудза чи інші зернові. На сьогодні, основна маса етанолу досі отримується з традиційної сировини — такий етанол називається етанолом першого покоління. Сировина та особливості процесу, що використовується для отримання етанолу, варіюють в різних регіонах, в основному в залежності від клімату. Тип вуглеводів, що отримуються після екстракції з рослин, визначає два основні типи традиційної сировини: крохмалевмісна сировина чи та, що містить ферментовані цукри.

Цукриста сировина, складається з вуглеводів, що можуть безпосередньо використовуватися для бродіння, таких як сахароза, глюкоза і фруктоза, походить з цукрової тростини, цукрового буряку або цукрового сорго. В цих рослинах, цукри акумулюються в великій кількості і легко екстрагуються. Цукристий сік, екстрагований з цих рослин, використовується або для виробництва цукру, або для виробництва етанолу. Побічними відходами під час виробництва цукру є меляса, яка містить залишкові кількості моно- і дисахаридів. Меляса є ідеальною дешевою сировиною для продукції етанолу. В більшості випадків, мелясу змішують з соком рослин, щоб уникнути інгібування ферментації, що спричиняється високою концентрацією інгібіторів в мелясі. Утилізація цукрової тростини для виробництва етанолу обмежується тропічними регіонами довкола екватора. В тропічному кліматі Бразилії, цукрова тростина є найбільш поширеною сировиною, що використовується для виробництва біоетанолу. Після екстракції цукру, рослинні залишки (так звана «багасса») можуть в подальшому використовуватися для виробництва етанолу. Етанол з цукрової тростини має найвищий енергетичний коефіцієнт, тому що вихід енергії при спалюванні цього етанолу в 6,45–9,53 рази вищий, ніж кількість енергії що потрібна для його продукції [4]. Процес виробництва біоетанолу в Бразилії було суттєво удосконалено протягом останніх трьох десятиліть. Заводи з вироблення етанолу функціонують переважно в режимі періодичного культивування дріжджів з підживленням [2] або безперервного культивування. Після ферментації, дріжджі відфільтровуються і ви-

користовуються повторно, для наступної ферментації, що забезпечує швидке проходження процесу і зниження ризику зараження культури. В помірному кліматі, наприклад в Європі чи Канаді, для отримання цукру чи етанолу вирощується цукровий буряк. Незважаючи на вищий в порівнянні з цукровою тростиною вміст цукрів в цукровому буряку, собівартість продукції етанолу (на літр етанолу) з цукрового буряка [2] є вищою, а енергетичний коефіцієнт — нижчим [4] в порівнянні з цукровою тростиною. Екстракція цукрів з буряку є більш складним процесом ніж для цукрової тростини і зазвичай рослинні залишки, що залишилися після екстракції, не можуть бути спалені для підігрівання ферментаційної суміші в процесі дистиляції. Ці залишки продаються як цінний корм для великої рогатої худоби.

Крохмалевмісна сировина походить з кукурудзи чи інших зернових і, зазвичай, використовується для продукції етанолу в регіонах з помірним кліматом. У Сполучених Штатах Америки, що є найбільшим світовим продуцентом етанолу, як сировина для продукції спирту переважно використовується кукурудза. В 2012 р., понад 300 мільйонів тон кукурудзи було зібрано в США і приблизно 40 % цієї кукурудзи було використано для продукції етанолу. З 2002 р. до початку 2010-их років продукція етанолу і відповідно продукція кукурудзи зростала експоненційно, що було зумовлено американською політикою орієнтації на підвищення використання відновлюваних джерел енергії. Однак протягом останніх кількох років продукція паливного етанолу в США збільшується незначно, а в 2016 р. навіть дещо зменшилася.

Процес продукції етанолу з крохмалю суттєво відрізняється від процесу його продукції з цукровмісної сировини. Спочатку зерна перемелюються для того, щоб зробити крохмаль доступним для гідролізу на подальших стадіях. До отриманого після перемелювання порошку додається вода, так щоб частка твердої речовини становила близько 30–35 %. Отриману крохмальну суспензію пропускають через нагрівальний пристрій, в якому гранули крохмалю желатинізуються при 70–90 °С. При цьому сильно зростає в'язкість желатинізованого крохмалю, що може утруднювати подальший процес переробки. Щоб уникнути цього, до су-

міші додається α -амілаза, яка здійснює частковий гідроліз крохмалю до розчинних мальтодекстринів [5]. Повне оцукрювання мальтодекстринів досягається після додавання глюкоамілази, що послідовно відщеплює залишки глюкози від невідновлюючого кінця олігосахаридів. Цей процес може відбуватися або перед початком ферментації (роздільний гідроліз і ферментація), або одночасно з процесом ферментації (одночасна сахарифікація і ферментація). На сьогодні, більшість заводів з виробництва етанолу, що використовують зерно, функціонують в режимі безперервної одночасної сахарифікації і ферментації [6], у зв'язку з тим, що вихід етанолу в цьому випадку є вищим, ніж порівнянні з роздільним гідролізом і ферментацією. Вищий вихід етанолу тут зумовлений тим, що контрольоване вивільнення цукрів допомагає уникнути різкого підвищення осмотичного тиску в культивативному середовищі, яке призводить до підвищення синтезу гліцерину під час ферментації. Також, нестача вільних цукрів пригнічує ріст мікроорганізмів. На противагу повторному використанні клітин під час виробництва етанолу, що практикується в Бразилії, в даному випадку для ферментації крохмалевмісної сировини використовуються активні висушені дріжджі, і нарощування біомаси цих дріжджів відбувається безпосередньо під час ферментації. Після ферментації і перегонки етанолу, з суспензії випаровується також вода, залишки ферментативної суміші висушуються і з них отримують гранули, що використовуються як корм для великої рогатої худоби.

Для отримання штамів дріжджів *S. cerevisiae*, здатних до надпродукції етанолу за рахунок зменшення нагромадження побічних продуктів бродіння (гліцерину [7, 8] або біомаси дріжджів [9, 10]) використовуються методи генної інженерії. Використання генетично модифікованих організмів, особливо у харчовій промисловості, досі зустрічає опір у споживачів продукту [11]. Одним із способів отримання надпродуктивних, що не передбачають безпосереднє втручання у геном дріжджів, є використання позитивної селекції або адаптивної еволюції [12].

Позитивна селекція та адаптивна еволюція передбачають використання таких умов куль-

тивування клітин, які б забезпечували збільшення кількості мутантів у популяції. Таким чином, культивування популяції клітин в певному селективному середовищі призведе до накопичення різноманітних адаптацій і отримання бажаного фенотипу [12, 13]. Так було отримано штами дріжджів, що здатні до анаеробної утилізації ксилози [14], штами з підвищеною здатністю до утилізації мальтози, штами з вищою осмотолерантністю [15].

Одним із нових способів отримання надпродуктивних етанолу є застосування поступової позитивної селекції з використанням кількох токсичних агентів [16]. Для такої селекції було обрано наступні токсичні речовини: окситіамін, що є токсичним аналогом тіаміну і може приєднуватися до активних центрів тіамін-залежних ферментів (зокрема транскетолази та піруватдекарбоксилази), знижуючи ефективність дії цих ферментів; трегалоза, що може інгібувати активність ферменту трегалозо-6-фосфатсинтази і таким чином *de novo* синтез цього дисахариду в стресових умовах; 3-бромпіруват, що інгібує активність ферменту гексакінази і спричиняє суттєве зниження внутрішньоклітинного рівня АТФ; гліоксилова кислота (гліоксилат), що є незворотнім інгібітором піруватдекарбоксилази; а також глюкозамін, що є структурним аналогом глюкози, який не може бути перетворений у фосфоглюкоізомеразній реакції і спричиняє блокування гліколізу на цьому етапі.

Для отримання мутантів, стійких до обраних токсичних селективних агентів, суспензію клітин промислового штаму *S. cerevisiae* AS400 [9] висівали на агаризоване середовище YNB, що містило токсичні селективні агенти у підібраних раніше концентраціях та інкубували протягом 7–14 днів залежно від селективних агентів. Поодинокі дріжджові колонії, стійкі до цих токсичних речовин, відбирали і повторно пересівали на свіжі чашки YNB, що містили відповідні концентрації реагенту. Відібрані мутанти були стабільними, зберігаючи стійкість до селективних агентів протягом тривалого часу. Отримані штами також виявилися стабільними за ознакою «надсинтез етанолу», після їх зберігання впродовж 6 міс при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. У отриманих штамів не виявлено перехресної стійкості до різних проаналізованих токсичних аген-

тів. До штамів, отриманих на гліюксилаті, були застосовані повторні раунди селекції на інших токсичних агентах, таким чином отримано штами резистентні до гліюксилату і глюкозаміну, а також штами резистентні до гліюксилату, глюкозаміну та бромпірувату.

При перевірці здатності до синтезу етанолу було виявлено, що штами *S. cerevisiae*, стійкі до токсичних селективних агентів, демонструють підвищення виходу етанолу під час ферментації глюкози на 5–8 % в порівнянні з вихідним штамом AS400 [16]. Один з отриманих штамів, AS400-510-42, що був відібраний з допомогою покрокової селекції на гліюксилаті та глюкозаміні, було використано в даній роботі.

Вивчення чинників, що мають інгібуючий вплив на метаболізм дріжджів під час спиртового бродіння, є надзвичайно важливим для вдосконалення технології отримання паливного етанолу. Також дуже важливо розуміти, який вплив на дріжджові клітини має сукупність чинників, адже саме така ситуація реально відображає промислові умови бродіння.

Найважливішими чинниками є: концентрація глюкози, що впливає на осмотичний тиск середовища; вміст етанолу, що змінюється в процесі спиртового бродіння; рН середовища та кислотність; концентрація сульфіту; висока температура [17].

При концентрації глюкози 2 г/л у дріжджових клітинах відбувається інгібування циклу Кребса та ферментів електрон-транспортного ланцюга – ефект Кребтрі [18]. Відповідно, за високої концентрації глюкози бродіння є основним шляхом її розщеплення навіть за аеробних умов. Але надто високі концентрації цукрів у суслі є причиною пригнічення процесу бродіння за рахунок підвищення осмотичного тиску та токсичного впливу етанолу на дріжджові клітини.

Антагоністичний вплив органічних кислот на метаболізм дріжджів є однією із головних проблем під час промислового виробництва спирту. Критичність впливу залежить від кількох факторів, а саме: концентрації кислот, штаму дріжджів, осмотичного тиску середовища та синергічного впливу інших чинників. Є велика кількість кислот, що завдають шкоди під час спиртового бродіння: оцтова, пропіо-

нова, ізобутанова, валеріанова, мурашина, молочна, октанова та деканова кислоти. Накопичення кислот у середовищі призводить до зміни рН, а також безпосередньо впливає на роботу протонних pomp і надходження поживних речовин всередину клітини [17].

Етанол у високих концентраціях також є токсичним для дріжджів. Толерантність до високих концентрацій етанолу залежить від штаму дріжджів (для найбільш толерантних штамів концентрація етанолу у середовищі може сягати більше 10 %) [19]. Алкогольдегідрогеназа та гексокіназа є чутливими до підвищеної концентрації етанолу. Найбільш чутливими є інвертаза, фруктозо-1,6-бісфосфатаза, альдолаза і піруватдекарбоксилаза. Інвертаза *S. cerevisiae* повністю інактивується при вмісті етанолу 8 % та високій концентрації солей у мелясі [20]. Також під дією етанолу можуть денатурувати інші клітинні білки, змінюється текучість плазматичної мембрани і, як наслідок, порушується функціонування транспортних систем [19, 21]. Знижується селективність плазматичної мембрани і зменшується мембранний потенціал, що перешкоджає нормальному проходженню усіх процесів, які потребують роботи протонних pomp [22]. До того ж, етанол інгібує функціонування мітохондрій, що спричиняє сповільнення транспорту глюкози в клітини, і, зрештою, інгібує ріст дріжджів та спиртове бродіння [23]. В науковій літературі було показано, що підвищення толерантності штамів *S. cerevisiae* до високих концентрацій етанолу дозволяє збільшити продукцію етанолу під час спиртового бродіння [24]. Наприклад, підвищення внутрішньоклітинної концентрації трегалози за рахунок інгібування ферменту кислої трегалази (що кодується геном *ATH1*) [25] або надекспресії гетерологічного гена *TPS1* з *Saccharomycopsis fibuligera*, що кодує трегалозо-6-фосфатсинтазу [26], забезпечувало підвищення резистентності дріжджів *S. cerevisiae* до етанолу з одночасним збільшенням продукції етанолу під час бродіння. Етанол-резистентні штами, отримані з допомогою УФ-мутагенезу, демонстрували підвищення продукції етанолу на 18 % у порівнянні зі штамом дикого типу [27]. В даній роботі описано селекцію штамів *S. cerevisiae* стійких

до одночасного впливу високих концентрацій глюкози та етанолу за допомогою адаптивної еволюції.

Матеріали і методи. Штами, середовища, умови культивування. У роботі використовували наступні штами *S. cerevisiae*: DY7221 – спиртові дріжджі *S. cerevisiae* раси DY7221 (Fermiol) колекції компанії DSM; AS400 [9]; AS400-510-42 – штам, отриманий на основі промислового продуцента етанолу AS400 шляхом позитивної селекції на гліоксилової кислоті та глюкозаміні [16]; Y-563 – триплоїдний гібридний штам дріжджів, що отримано шляхом схрещування осмофільного спиртового штаму *S. cerevisiae* Ш-1 з хлібопекарськими штамом *S. cerevisiae* 2–10, що повністю зброджує рафінозу; PE-2 [28].

Дріжджі вирощували при температурі 30 °С у напівсинтетичному середовищі: YNB (Yeast Nitrogen Base – мінімальне середовище) у кількості 1,7 г/л з додаванням сульфату амонію (5 г/л) та джерела вуглецю (20 г/л), а також урацилу, гістидину, лізину та лейцину (100 мг/л), або у багатому середовищі YPD (5 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л пептону, 20 г/л джерела вуглецю).

Клітини дріжджів вирощували у пробірках об'ємом 20 мл, що містили 4 мл середовища, колбах Ерленмейера на 300 мл, що містили 100 мл середовища у повітряному шейкері-інкубаторі Inkubator 1000 виробництва Heidolph (Швабах, Німеччина) та на чашках Петрі з 25 мл агаризованого середовища в термостаті при 30 °С.

Умови спиртового бродіння дріжджів. Для визначення продукції етанолу при алкогольної ферментації глюкози клітини дріжджів *S. cerevisiae* нарощували в багатому середовищі YPD впродовж доби. Біомасу (1,2 г/л клітин) переносили в мінеральне середовище YNB або багате середовище YP з додаванням 20–25 % глюкози. Ферментація проводилася при температурі 35 °С за умов обмеженої аерації (120 об/хв). У роботі також використовувалося промислове середовище, що використовується для виробництва спирту із гідролізатів пшениці на ДП Угерський спиртзавод і середовище, що використовується на спиртових заводах компанії ADM (США). Гідролізати пшениці було отримано з підприємства ДП Угерський спиртзавод і додатково оброблено ферментами α -амілазою

(Liquizyme SC) та глюкоамілазою при 45 °С впродовж 15–20 год. Концентрація глюкози у такому середовищі становила 120–130 г/л. Підготовка CSL (від corn steep liquor) [9] середовища на основі рідкого кукурудзяного екстракту проводилася при змішуванні двох розчинів. Для отримання першого розчину 200 г кукурудзяного борошна (Melvit, Poland) ресуспендували в 800 мл води, рН доводили до 6 за допомогою NaOH. Для гідролізу крохмалю додавали α -амілазу (Liquizyme SC) із розрахунку 0,1 МО/г борошна та інкубували 30 хв при 80 °С з перемішуванням. Для приготування другого розчину 63 мл CSL концентрату (містить ~50 % сухих речовин) ресуспендували в 137 мл води. Обидва розчини автоклавували, охолоджували та змішували. Для вивільнення глюкози в середовище стерильно додавали глюкоамілазу 0,2 МО/г борошна та інкубували одну добу при 30 °С з перемішуванням. Концентрація глюкози у CSL середовищі також становила 120–130 г/л. Клітини *S. cerevisiae* нарощували в багатому середовищі YPD впродовж доби, дріжджову біомасу (10 г/л клітин, це щільність клітин, яка звичайно використовується в промисловому спиртовому бродінні [29]) переносили в промислове поживне середовище. Ферментацію проводили при 35 °С за умов обмеженої аерації (120 об/хв). Зразки для аналізу етанолу відбирали через 19 год. Експерименти алкогольної ферментації проводили щонайменше у трьох повторах.

Визначення вмісту етанолу, глюкози та гліцерину в пробах. Вміст етанолу, глюкози та гліцерину в пробах визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (PerkinElmer, Series 2000, USA), використовуючи іонообмінну колонку Aminex HPLX-87H (BioRad, Hercules, USA). Як рухоми фазу використовували 4 мМ H₂SO₄ при швидкості потоку 0,6 мл/хв і температурі колонки 30 °С.

Адаптація штамів *S. cerevisiae* до високих концентрацій глюкози та етанолу. Для адаптації дріжджів *S. cerevisiae* до росту на середовищі з високими концентраціями глюкози та етанолу проводили послідовні пересіви клітин дріжджів на середовищах з високими концентраціями цих сполук.

Культивування здійснювати у колбах Ерленмейера об'ємом 100 мл, що містили 50 мл се-

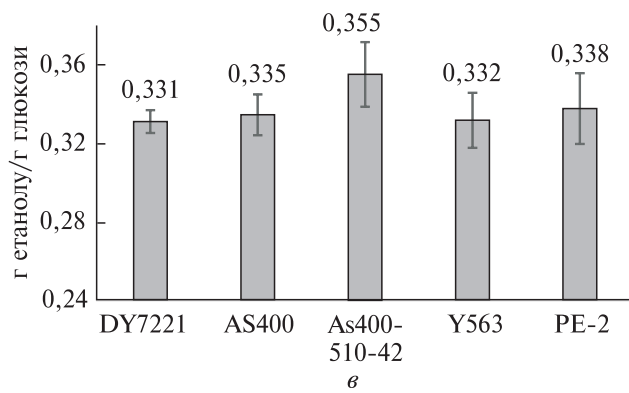
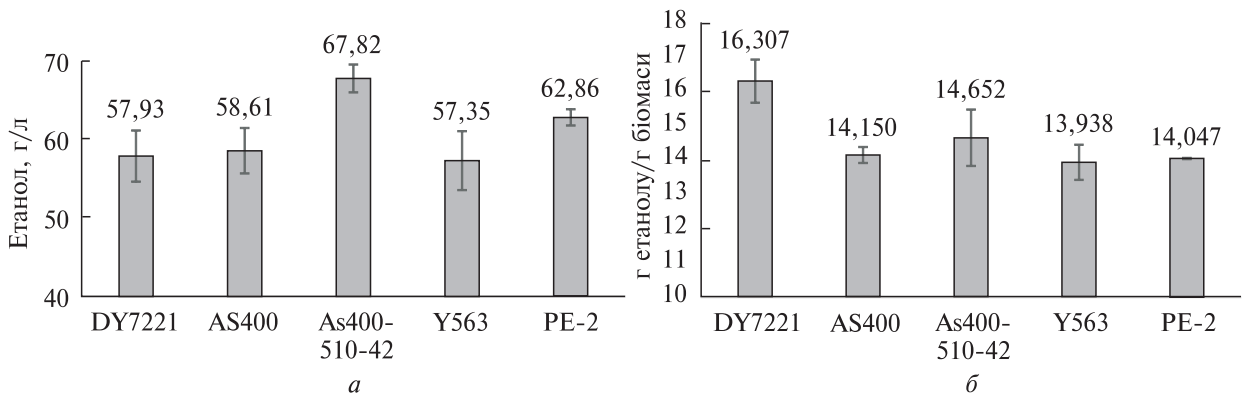


Рис. 1. Продукція етанолу у г/л (а), продуктивність у г етанолу/г біомаси (б) та вихід етанолу (в) у штамів *S. cerevisiae* DY7221; AS400; AS400-510-42; Y-563 та PE-2 на 47 год алкогольної ферментації на мінеральному середовищі YNB з 20 % глюкозою; по горизонталі – штам

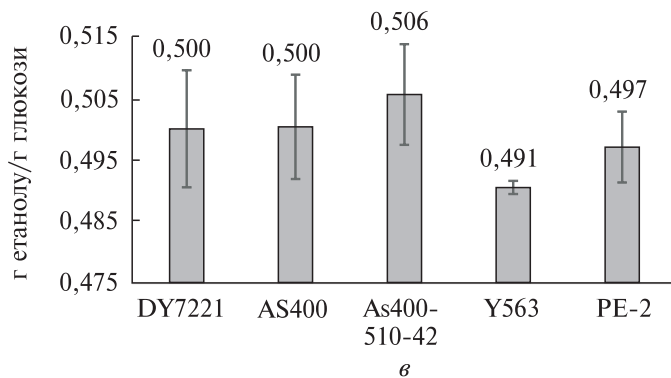
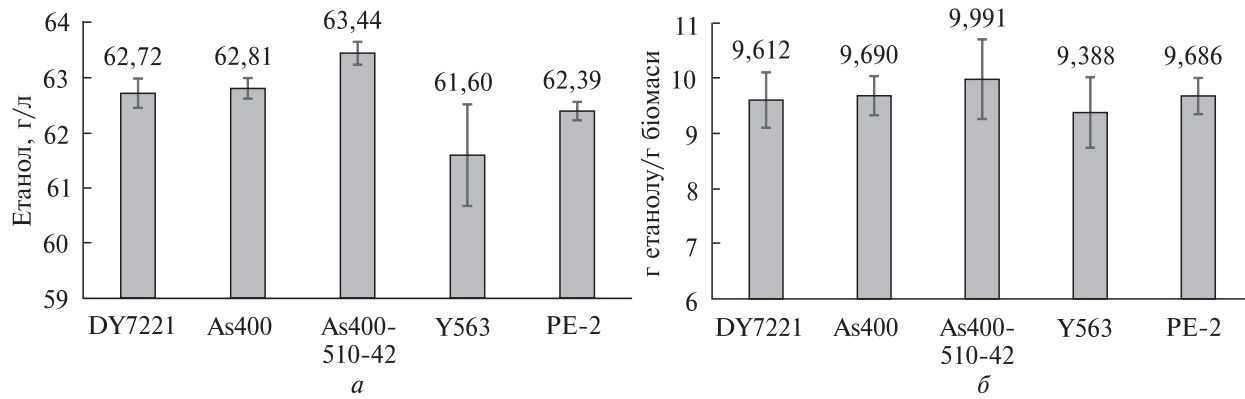


Рис. 2. Продукція етанолу у г/л (а), продуктивність у г етанолу/г біомаси (б) та вихід етанолу (в) у штамів *S. cerevisiae* DY7221; AS400; AS400-510-42; Y-563 та PE-2 на 19 год алкогольної ферментації на промисловому середовищі, що використовується для виробництва спирту із гідролізатів пшениці на ДП Угерський спиртзавод (13 % глюкоза); по горизонталі – штам

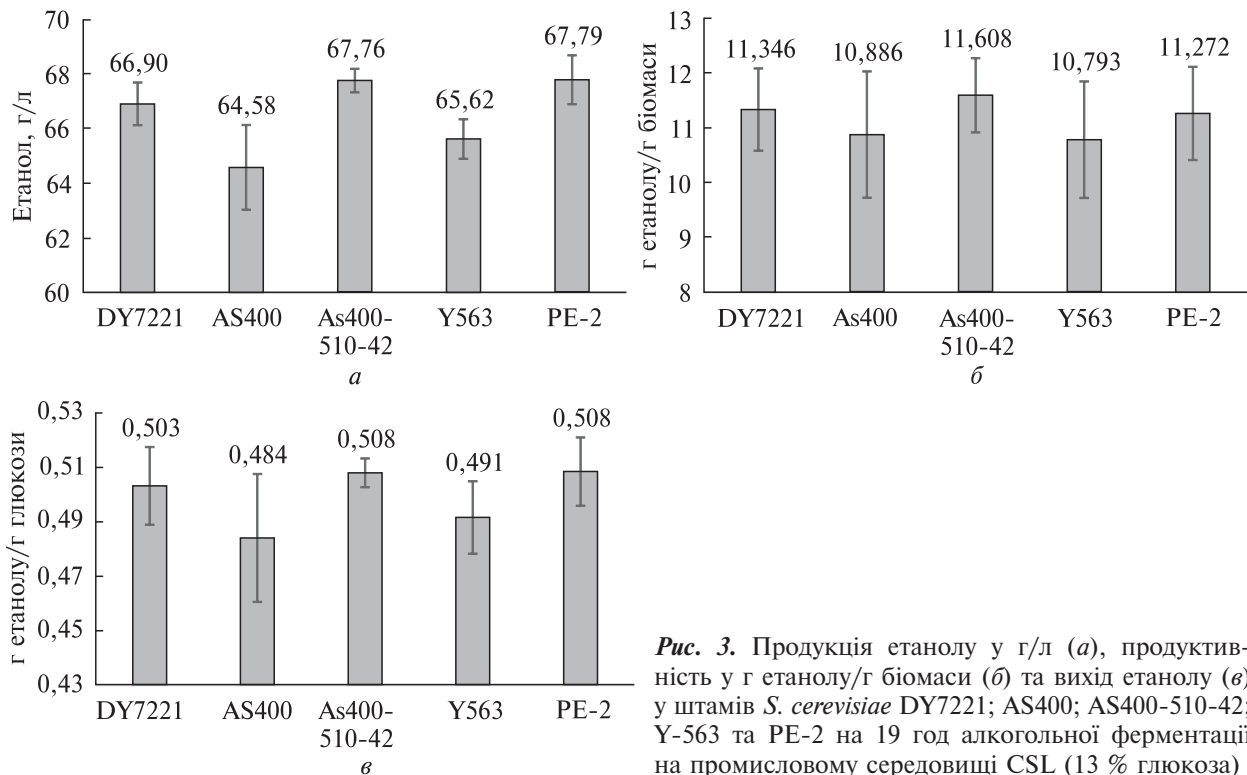


Рис. 3. Продукція етанолу у г/л (а), продуктивність у г етанолу/г біомаси (б) та вихід етанолу (в) у штамів *S. cerevisiae* DY7221; AS400; AS400-510-42; Y-563 та PE-2 на 19 год алкогольної ферментації на промисловому середовищі CSL (13 % глюкоза)

редовища з додаванням глюкози та етанолу впродовж 6 діб на круговій качалці (швидкість обертання 230 об./хв) за температури 35 °С. На 7 добу культивування нарощену біомасу використовували для інокуляції 4 мл мінерального середовища YNB в пробірках. Початкова концентрація біомаси становила 0,06 г/л (суха вага). Пробірки витримували на круговій качалці за тих же умов впродовж 1 доби.

Нарощену у пробірках біомасу використовували для повторної інокуляції 50 мл середовища у колбах Ерленмейера з початковою концентрацією біомаси 0,03 г/л (суха вага).

Під час пересіву для оцінки кількості живих клітин готували суспензію клітин з розведенням у 10000 раз з подальшим засівом на агаризоване середовище YNB з додаванням глюкози та етанолу. Після культивування чашок Петрі протягом 6 діб у термостаті за температури 28 °С з чашок відбирали поодинокі колонії та здійснювали пересів на агаризоване середовище YNB з додаванням глюкози та етанолу для подальшого використання та аналізу відібраних колоній дріжджів.

Для збереження кожного пасажу дріжджів проводили заморожування суспензії клітин у 30%-ному розчині гліцерину.

Результати досліджень та їхнє обговорення.

Продукція етанолу штамми спиртових дріжджів S. cerevisiae під час алкогольної ферментації на поживних середовищах різного складу. Для порівняння різних промислових продуцентів етанолу, ми перевіряли здатність штамів *S. cerevisiae* DY7221; AS400; AS400-510-42; Y-563 та PE-2 до продукції етанолу на середовищах різного складу. Ферментація проводилася як описано в розділі матеріали і методи. Результати представлено на рис. 1–3.

Як видно з рис. 1–3, штам AS400-510-42 мав найвищі показники продукції, продуктивності та виходу етанолу при ферментації на середовищах YNB, CSL та гідролізаті пшениці. Однак при ферментації на гідролізаті пшениці з додаванням додаткової глюкози найвищі показники демонстрував штам AS400, а при ферментації на середовищі CSL з додаванням додаткової глюкози – штам PE-2 (дані не представлено). Можна зробити висновок, що

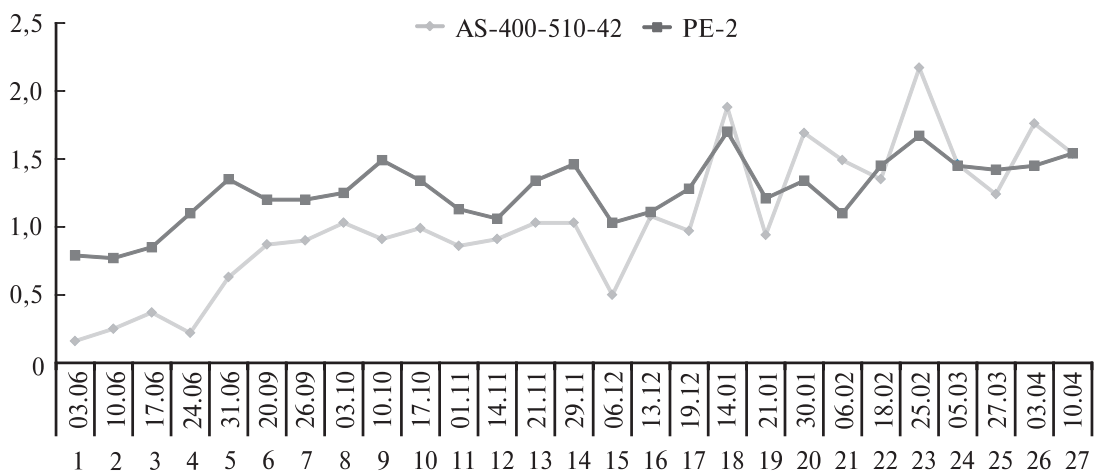


Рис. 4. Накопичення біомаси дріжджами *S. cerevisiae* штамів AS400-510-42 та PE-2 під час росту на середовищі YNB з 24 % глюкози і 8 % етанолу в процесі адаптивної еволюції

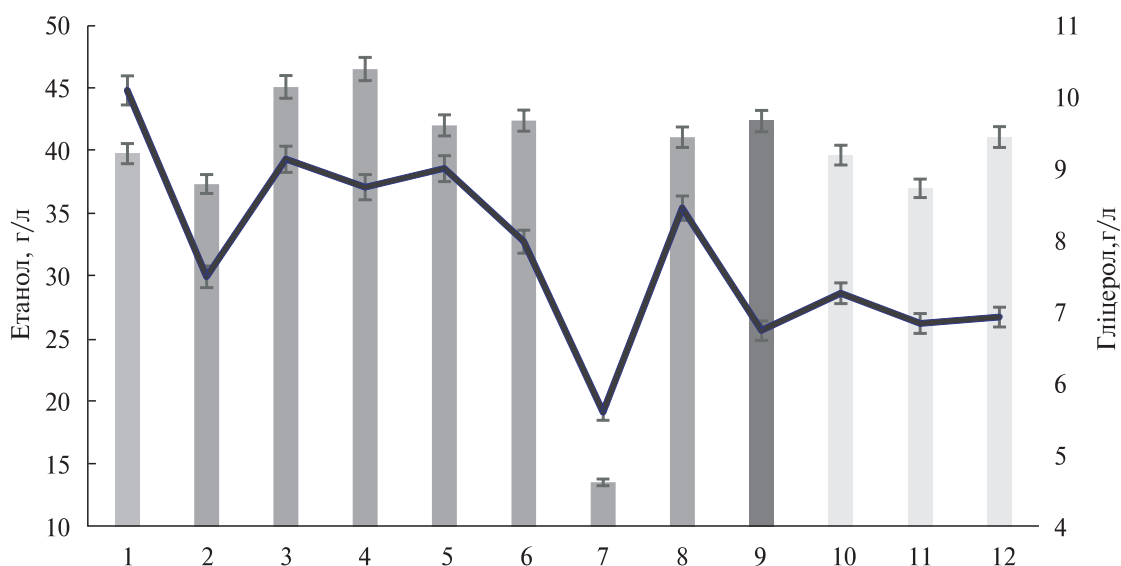


Рис. 5. Утворення етанолу та гліцерину штамми дріжджів дикого типу та адаптованими штамми на середовищі YNB з додаванням глюкози (25 % від об'єму середовища); по горизонталі: 1 – AS400-510-42, 2 – AS400-510-42 ev 2.4, 3 – AS400-510-42 ev 2.6, 4 – AS400-510-42 ev 2.12, 5 – AS400-510-42 ev 2.17, 6 – AS400-510-42 ev 3.1, 7 – AS400-510-42 ev 3.11, 8 – AS400-510-42 ev 3.12, 9 – PE-2, 10 – PE-2 ev 2.18D, 11 – PE-2 ev 4.3, 12 – PE-2 ev 4.12

штам AS400-510-42 виявляє ліпші параметри алкогольної ферментації при нижчій концентрації глюкози в середовищі. Однак у промислових умовах ферментаційні середовища зазвичай мають дуже високий вміст глюкози, тому ми вирішили адаптувати цей штам, а також штам PE-2 до росту на середовищі з високою концентрацією глюкози та етанолу.

Адаптація дріжджових штамів до росту на середовищі з додаванням глюкози та етанолу. Для адаптації дріжджів *S. cerevisiae* AS400-510-42 та PE-2 до росту на середовищі з високими концентраціями глюкози та етанолу ці штамми дріжджів пересівали послідовними пасажами згідно з методикою описаною в розділі матеріали і методи впродовж 10 місяців. Кон-

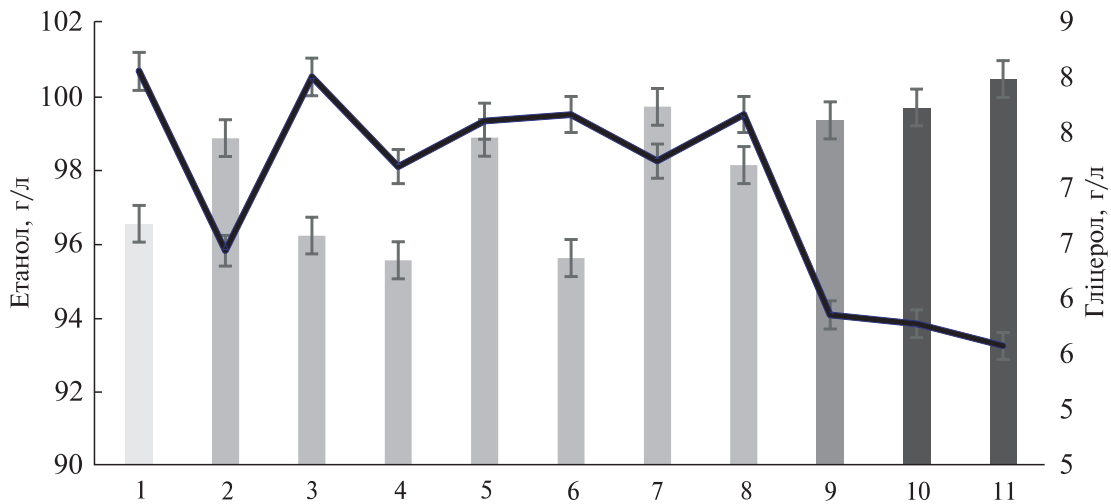


Рис. 6. Утворення етанолу та гліцерину штамми дріжджів дикого типу та адаптованими штамми на середовищі YP з додаванням глюкози (25 % від об'єму середовища)

центрація глюкози та етанолу в середовищі поступово збільшувалася: спочатку 20 % глюкози і 6 % етанолу, потім 22 % глюкози і 7 % етанолу і зрештою 24 % глюкози і 8 % етанолу. За час адаптації ріст штаму AS400-510-42 на середовищі з високою концентрацією глюкози та етанолу суттєво покращився, тоді як накопичення біомаси у штаму PE-2 зросло в меншій мірі (рис. 4).

Було відібрано 10 штамів дріжджів, що пройшли процес адаптивної еволюції: 7 штамів-похідних AS400-510-42 та 3 штамів-похідних PE-2. Їх було перевірено на чистоту культури та використано для проведення спиртового бродіння.

Для перевірки чистоти культури відібраних штамів дріжджів було виділено геномну ДНК з штамів AS400-510-42 та PE-2, 10 штамів, що пройшли процес адаптивної еволюції, штаму дріжджів *Debaryomyces hansenii* CBC 767 та *Scheffersomyces stipitis* PJH як контролю. Для ампліфікації фрагментів внутрішнього транскрибованого спейсеру (Internal Transcribed Spacer (ITS)) дріжджової рибосомальної ДНК проводили полімеразну ланцюгову реакцію з використанням праймерів ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) та ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) [30]. Подальша перевірка довжини отриманих фрагментів здійснювалась з допомогою гель-електрофорезу. Всі відібрані адаптовані дріжджі були чистими культурами одного виду *S. cerevisiae*.

Аналіз ефективності спиртового бродіння у адаптованих штамів. Спиртове бродіння з отриманими адаптованими штамми проводили в 20 мл середовища YNB з додаванням 25 % глюкози. Культивування дріжджів здійснювали за температури 35 °C за умов обмеженої аерації (на шейкері з перемішуванням 120 об./хв) впродовж 3 днів зі визначенням кількості етанолу та гліцерину в поживному середовищі на 3, 21, 44 та 68 год культивування.

Серед проаналізованих штамів-похідних AS400-510-42 найбільшу кількість етанолу під час спиртового бродіння продукував штам AS400-510-42 ev 2.12: 46,50 г/л етанолу, при цьому він також продукував менше гліцерину ніж вихідний штам: 8,74 г/л гліцерину проти 10,09 г/л гліцерину в штаму AS400-510-42 (рис. 5). Серед проаналізованих штамів-похідних PE-2 жоден не продукував більше етанолу ніж вихідний штам, що не проходив процес адаптації (рис. 5).

Оскільки під час спиртового бродіння на середовищі YNB дріжджі споживали лише 52–57 % наявної в середовищі глюкози, було вирішено також провести ферментацію на багатому поживному середовищі YP, що містило 25 % глюкозу. Культивування дріжджів здійснювали за температури 35 °C за таких самих умов, як і в попередньому випадку, кількості етанолу та гліцерину в середовищі визначали на 5, 22, 43 та 47 год бродіння. При культиву-

ванні на такому середовищі відсоток спожитої глюкози становив від 96,96 до 99,96 %, тобто глюкоза утилізувалася дріжджами практично повністю.

Серед аналізованих штамів найбільшу кількість етанолу під час спиртового бродіння на багатому поживному середовищі YP з високою концентрацією глюкози продукував штам AS400-510-42 cv 3.11: 99,69 г/л етанолу проти 96,52 г/л етанолу в штаму AS400-510-42, продукція гліцерину в цього штаму знижувалася: 7,74 г/л гліцерину проти 8,55 г/л в штаму AS400-510-42 (рис. 6).

Серед штамів-похідних PE-2 найбільшу кількість етанолу і найменшу кількість гліцерину під час спиртового бродіння продукував штам PE-2 cv 4.12 – 100,44 г/л етанолу проти 99,32 г/л у PE-2 та 6,07 г/л гліцерину проти 6,35 г/л у PE-2 (рис. 6). Отже, за рахунок проведення адаптивної еволюції впродовж 10 місяців отримано штам-похідні промислових продуцентів етанолу AS400-510-42 та PE-2, що краще ростуть в середовищі з високим вмістом етанолу та глюкози. Коли ефективність спиртового бродіння у адаптованих штамів було проаналізовано на середовищі YNB з додаванням 25 % глюкози, 5 з 7 похідних AS400-510-42 продукували більше етанолу в порівнянні з вихідним штамом, тоді як жоден з похідних PE-2 не виявляв покращеної продукції етанолу (рис. 5). Коли ж ефективність спиртового бродіння у адаптованих штамів було проаналізовано на середовищі YP з додаванням 25 % глюкози, 4 з 7 похідних AS400-510-42 і 2 з 2 похідних PE-2 продукували більше етанолу в порівнянні з вихідним штамом (рис. 6). Загалом, можна сказати, що адаптивна еволюція була більш успішною для штаму AS400-510-42, оскільки резистентність до високих концентрацій етанолу і глюкози, а також здатність продукувати етанол під час алкогольної ферментації у цього штаму підвищилася сильніше в порівнянні зі штамом PE-2. Можливо, це пов'язано з тим, що початковий рівень резистентності до високих концентрацій глюкози і етанолу в штаму AS400-510-42 був значно нижчим у порівнянні зі штамом PE-2 (див. початкові точки на рис. 4), отже штам AS400-510-42 мав більший простір для вдосконалення по цих параметрах. Також, слід

відмітити, що найкращі штам-продуценти етанолу було відібрано на проміжних а не на кінцевих етапах адаптивної еволюції. Це легко пояснити, якщо звернути увагу на флуктуації біомаси на рис. 4 – на кінцевих етапах еволюції накопичення біомаси (а отже, і резистентність до високих концентрацій глюкози і етанолу) дещо знижувалася. Отже, адаптивна еволюція з періодичними пасажами культури є до певної міри випадковим процесом, оскільки покращені властивості культури можуть втрачатися під час наступних пересівів. Саме тому необхідно зберігати культуру клітин при кожному пересіві шляхом їх замороження у 30 % гліцерині.

Загалом, адаптивна еволюція є хорошим методом отримання покращених продуцентів етанолу без застосування генної інженерії. Отримані штам-продуценти можна використовувати для промислової продукції етанолу або як вихідні штам-продуценти для подальшої адаптивної еволюції (можливо, шляхом адаптації до інших сполук, що мають інгібуючу дію під час спиртового бродіння, наприклад органічних кислот).

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 роботи. Дана робота фінансувалася Національною Академією Наук України (науково-технічний проект НАН України №44-18 «Розробка технології отримання етилового спирту на основі сконструйованих штамів спиртових дріжджів здатних до надпродукції етанолу»).

ADAPTIVE EVOLUTION FOR THE IMPROVEMENT OF ETHANOL PRODUCTION DURING ALCOHOLIC FERMENTATION WITH THE INDUSTRIAL STRAINS OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A. Zazulya, M. Semkiv, K. Dmytruk, A. Sibirny

Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv 79005 Ukraine

E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

Ethanol is one of the most important biotechnological compounds widely used in medicine, pharmacology, fo-

od and fuel, cosmetology and other fields. The main method of ethanol production is alcoholic fermentation using baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* converts glucose to ethanol very efficiently: ethanol yield is more than 90 % of the theoretical maximum. However, even a slight increase in ethanol yield in an industrial-scale alcoholic fermentation can produce an additional hundred million tons of ethanol each year. In this work, to increase the production of ethanol with industrial *S. cerevisiae* strains, we applied the method of adaptive evolution: yeast cells were cultivated long-term in an environment with high concentrations of glucose and ethanol. Most of the adapted strains obtained were characterized by increased ethanol production during alcoholic fermentation in comparison with the original strains.

АДАПТИВНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЭТАНОЛА ВО ВРЕМЯ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ В ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

А. Зазуля, М. Семкив, К. Дмитрук, А. Сибирный

Этанол — одно из важнейших соединений, широко используется в медицине, фармакологии, пищевой и топливной промышленности, косметологии и других отраслях. Основным способом производства этанола является брожение с использованием пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* превращают глюкозу в этанол очень эффективно: выход этанола составляет более 90 % от теоретического максимума. Однако даже незначительное повышение выхода этанола в процессе алкогольной ферментации в промышленных масштабах может обеспечивать продукцию дополнительных сотен миллионов тонн этанола ежегодно. В данной работе для повышения продукции этанола в промышленных штаммов *S. cerevisiae* мы применили метод адаптивной эволюции: длительного культивирования в среде с высокими концентрациями глюкозы и этанола. Большинство из полученных адаптированных штаммов характеризовались повышенной продукцией этанола во время спиртового брожения по сравнению с исходными штаммами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dmytruk, K.V., Kurylenko, O.O., Ruchala, J., Abbas, C.A., and Sibirny, A.A., *Genetic Improvement of Conventional and Nonconventional Yeasts for the Production of First- and Second-Generation Ethanol*. Springer International Publishing, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-58829-2_1
2. Basso, L.C., Basso, T.O., and Rocha, S.N., *Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation*, InTech, 2011.
3. Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund,

- M.F., Liden, G. and Zacchi, G., Bio-ethanol — the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnol.* 2006, vol. 24, no. 12, pp. 549–56. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.10.004.
4. Dos Santos, M.A., *Energy analysis of crops used for producing ethanol and CO₂ emissions*, The International Virtual Institute of Global Change (IVIG), 1997.
5. Douglas Crabb, W., Mitchinson, C., Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in biotechnol.* 1997, vol. 15, pp. 349–52. doi: 10.1016/S0167-7799(97)01082-2.
6. Madson, P.W., Monceaux, D.A., *Fuel ethanol production*, Nottingham: University Press, 1999.
7. Guo, Z.P., Zhang, L., Ding, Z.Y., and Shi, G.Y., Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. *Metabol. Engineer.* 2011, vol. 13, no. 1, pp. 49–59. doi: 10.1016/j.ymben.2010.11.003.
8. Zhang, L., Tang, Y., Guo, Z.P., Ding, Z.Y., and Shi, G.Y., Improving the ethanol yield by reducing glycerol formation using cofactor regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 2011, vol. 33, no. 7, pp. 1375–80. doi: 10.1007/s10529-011-0588-6.
9. Semkiv, M.V., Dmytruk, K.V., Abbas, C.A., and Sibirny, A.A., Increased ethanol accumulation from glucose via reduction of ATP level in a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing alkaline phosphatase. *BMC biotechnol.* 2014, vol. 14, pp. 42. doi: 10.1186/1472-6750-14-42.
10. Semkiv, M.V., Dmytruk, K.V., Abbas, C.A., and Sibirny, A.A., Activation of futile cycles as an approach to increase ethanol yield during glucose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioengineered.* 2016, vol. 7, no. 2, pp. 106–11. doi:10.1080/21655979.2016.1148223.
11. Grossmann, M., Kießling, F., Singer, J., Schoeman, H., Schröder, M.-B., and von Wallbrunn, C., Genetically modified wine yeasts and risk assessment studies covering different steps within the wine making process. *Ann. Microbiol.* 2011, vol. 61, no. 1, pp. 103–15. doi: 10.1007/s13213-010-0088-2.
12. Chambers, P.J., Bellon, J.R., Schmidt, S.A., Varela, C., and Pretorius, I.S., *Non-Genetic Engineering Approaches for Isolating and Generating Novel Yeasts for Industrial Applications*. Springer Netherlands, 2009. doi: 10.1007/978-1-4020-8292-4_20
13. Cakar, Z.P., Seker, U.O., Tamerler, C., Sonderegger, M., and Sauer, U., Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, 2005, vol. 5, no. 6–7, pp. 569–78. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.10.010.
14. Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T., Evolutionary

- engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain, *FEMS Yeast Res.*, 2005, vol. 5, no. 10, pp. 925–34. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.04.004.
15. Higgins, V.J., Bell, P.J., Dawes, I.W., and Attfield, P.V., Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques, *App. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, no. 9, pp. 4346–8. doi: 10.1128/AEM.67.9.4346-4348.2001.
 16. Dmytruk, K.V., Kshanovska, B.V., Abbas, C.A., and Sibirny, A.A., New methods for positive selection of yeast ethanol overproducing mutants. *Bioethanol*. 2016, vol. 2, pp. 24–31. doi: 10.1515/bioeth-2015-0003.
 17. de Oliva-Neto, P., Dorta, C., Carvalho, A.F., de Lima, V.M.G., and da Silva, D.F., *The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation-yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology*, ©FORMATEX, 2013.
 18. Chapman, C., Bartley, W., The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. *Biochem. J.* 1968, vol. 107, no. 4, pp. 455–65. doi: 10.1042/bj1070455.
 19. Beaven, M.J., Charpentier, C., and Rose, A.H., Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Microbiol.* 1982, vol. 128, no. 7, pp. 1447–55. doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-128-7-1447>.
 20. Millar, D.G., Griffiths-Smith, K., Algar, E., and Scopes, R.K., Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.* 1982, vol. 4, no. 9, pp. 601–6. doi: 10.1007/BF00127792.
 21. Loureiro-Dias, M.C., Peinado, J.M., Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 1982, vol. 4, no. 11, pp. 721–4. doi: 10.1007/BF00-134666.
 22. Ingram, L.O., Adaptation of membrane lipids to alcohols, *J. bacteriol.* 1976, vol. 125, no. 2, pp. 670–8. PMID: PMC236128.
 23. Moon, M.H., Ryu, J., Choeng, Y.-H., Hong, S.-K., Kang, H.A., and Chang, Y.K., Enhancement of stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a trehalose biosynthetic gene from *Streptomyces albus*. *Biotechnol. Bioproc. Engineer.* 2012, vol. 17, no. 5, pp. 986–96. doi: 10.1007/s12257-012-0148-5.
 24. Qiu, Z. and Jiang, R., Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. *Biotechnol. Biof.* 2017, vol. 10, pp. 125. doi: 10.1186/s13068-017-0806-0.
 25. Jung, Y.J., Park, H.D., Antisense-mediated inhibition of acid trehalase (ATH1) gene expression promotes ethanol fermentation and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 2005, vol. 27, no. 23–24, pp. 1855–9. doi: 10.1007/s10529-005-3910-3.
 26. Cao, T.S., Chi, Z., Liu, G.L., and Chi, Z.M., Expression of TPS1 gene from *Saccharomycopsis fibuligera* A11 in *Saccharomyces* sp. W0 enhances trehalose accumulation, ethanol tolerance, and ethanol production. *Mol. Biotechnol.* 2014, vol. 56, no. 1, pp. 72–8. doi: 10.1007/s12033-013-9683-3.
 27. Thammasittirong, S.N.-R., Thirasaktana, T., Thammasittirong, A., and Srisodsuk, M., *Improvement of ethanol production by ethanol-tolerant Saccharomyces cerevisiae UVNR56*. SpringerPlus. 2013. doi: 10.1186/2193-1801-2-583.
 28. Argueso, J.L., Carazzolle, M.F., Mieczkowski, P.A., Duarte, F.M., Netto, O.V., Missawa, S.K., Galzerani, F., Costa, G.G., Vidal, R.O., Noronha, M.F., Dominska, M., Andrietta, M.G., Andrietta, S.R., Cunha, A.F., Gomes, L.H., Tavares, F.C., Alcarde, A.R., Dietrich, F.S., McCusker, J.H., Petes, T.D., and Pereira, G.A., Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res.* 2009, vol. 19, no. 12, pp. 2258–70. doi: 10.1101/gr.091777.109.
 29. Lin, Y., Tanaka, S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, vol. 69, no. 6, pp. 627–42. doi: 10.1007/s00253-005-0229-x.
 30. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A., Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, vol. 49, no. 1, pp. 329–37. doi: 10.1099/00207713-49-1-329.

Надійшла в редакцію 10.03.20
Після доопрацювання 24.03.20
Прийнята до друку 18.09.20