

**OBTAINING PRACTICALLY VALUABLE COMPOUNDS  
WITH THE USE OF RECOMBINANT YEAST  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. PART ONE:  
SYNTHESIS OF ETHANOL, BUTANOL AND ISOBUTANOL**

V. Potapenko, O. Skrotska

National University of Food Technologies

---

**Key words:**

*Saccharomyces cerevisiae*  
*Recombinant yeast*  
*Bioethanol*,  
*Biobutanol*  
*Isobutanol*

---

**Article history:**

Received 18.09.2020  
Received in revised form  
09.10.2020  
Accepted 23.10.2020

---

**Corresponding author:**

V. Potapenko  
**E-mail:**  
npnuht@ukr.net

**ABSTRACT**

---

With the development of genetic engineering methods, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* began to be used as an expression platform for the production of practically valuable compounds, in particular alcohol, which can be used as biofuel. Today *S. cerevisiae* cells are a widely studied model eukaryo system at the molecular level, which can be used with a large number of available genetic tools.

This review analyzes the modern scientific literature on the production of ethanol, butanol and isobutanol using genetically modified *S. cerevisiae* cells.

Modern research on the possibility of obtaining bioethanol using microbial synthesis is aimed at using lignocellulosic raw materials as a reducing energy source. Therefore, the aim of constructing recombinant *S. cerevisiae* strains is to create cells that will be able to consume sugar of lignocellulosic materials. Since *Saccharomycetes* are not capable for catabolizing xylose, yeast modification is carried out using such heterologous pathways as xylose reductase-xylitol dehydrogenase or xylose isomerase. The next challenge is to create *S. cerevisiae* strains that are capable for simultaneously fermenting mixed sugar of lignocellulosic materials. Since in the process of pretreatment of lignocellulosic raw materials by physical or chemical methods, a large number of toxic compounds are formed that are inhibitors of microbial fermentation, one of the tasks is to design *S. cerevisiae* that will be resistant to the effects of various inhibitors.

The microbiological production of butanol was one of the first large-scale industrial process of global importance. Research of this process, despite its 100-year history of development, continues nowadays. Bacteria of the genus *Clostridium* are natural butanol producer. Due to a number of disadvantages of their use, the attention of scientists is attracted by other microorganisms that are widely used on an industrial scale, in particular the yeast *S. cerevisiae*.

Isobutanol is the next generation biofuel. This alcohol is a by-product of the synthesis of valine in *S. cerevisiae*. To increase its synthesis, recombinant yeast strains are created using various strategies of genetic and metabolic engineering.

## ОТРИМАННЯ ПРАКТИЧНО ЦІННИХ СПЛУК З ВИКОРИСТАННЯМ РЕКОМБІНАНТНИХ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. ЧАСТИНА 1: СИНТЕЗ ЕТАНОЛУ, БУТАНОЛУ ТА ІЗОБУТАНОЛУ

В. В. Потапенко, О. І. Скроцька

Національний університет харчових технологій

У пропонованому огляді зроблено аналіз сучасної наукової літератури щодо отримання етанолу, бутанолу та ізобутанолу з використанням генетично модифікованих клітин *S. cerevisiae*.

Сучасні дослідження щодо можливості отримання біоетанолу за допомогою мікробного синтезу спрямовані на використання лігноцелюлозної сировини як поновлювального джерела енергії, тому метою конструювання рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* є створення клітин, здатних споживати цукри лігноцелюлозних матеріалів. Оскільки сахароміцети не здатні катаболізувати ксилозу, модифікацію дріжджів проводять, використовуючи такі гетерологічні шляхи, як ксилоредуктазно-ксилітолдегідрогеназний або ксилозізомеразний. Наступним завданням є створення штамів *S. cerevisiae*, здатних одночасно зброджувати змішані цукри лігноцелюлозних матеріалів. У процесі попередньої обробки лігноцелюлозної сировини фізичними чи хімічними методами утворюється велика кількість токсичних сполук, які є інгібіторами мікробної ферментації, тому одним із завдань є конструювання *S. cerevisiae*, що будуть стійкими до дії різних інгібіторів.

Мікробіологічне виробництво бутанолу було одним з перших широкомасштабних промислових процесів глобального значення. Дослідження цього процесу, незважаючи на його столітню історію розвитку, продовжуються і нині. Природними продуцентами бутанолу є бактерії роду *Clostridium*. Через ряд недоліків їх застосування увагу науковців привертають інші мікроорганізми, які широко використовуються у промислових масштабах, зокрема дріжджі *S. cerevisiae*.

Ізобутанол є біопаливом наступного покоління. Це побічний продукт синтезу валіну у *S. cerevisiae*. Для збільшення його синтезу створюють рекомбінантні штами дріжджів, використовуючи різні стратегії генетичної та метаболічної інженерії.

**Ключові слова:** *Saccharomyces cerevisiae*, рекомбінантні дріжджі, біоетанол, біобутанол, ізобутанол.

**Постановка проблеми.** Традиційні сфери використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* — це хлібопечення, виноробство, пивоваріння, виробництво спирту, виготовлення квасу, отримання кормового білка та використання як добавки до кормів сільськогосподарських тварин [1—3]. З розвитком методів генної інженерії їх стали використовувати як експресійну платформу для отримання практично цінних сполук, зокрема спиртів, які можна використати як біопаливо [4—8].

Мікробіологічний синтез біопалива з використанням поновлювальних джерел енергії є альтернативою нафтопереробним заводам. Хоч нафта і є одним із найбільш важливих джерел енергії, але її запаси не є невичерпними [9], тому розробка технологій поновлюваного й економічно вигідного біопалива є актуальним завданням сьогодення.

При розробці економічних процесів мікробної конверсії в промислових масштабах необхідно враховувати, що субстрати для мікробного синтезу повинні бути дешевими, екологічними і не конкурувати з продуктами харчування. Саме тому лігноцелюозна сировина є найбільш перспективним поновлювальним джерелом, що відповідає вказаним вимогам [10]. Глюкоза і ксилоза — найбільш поширені моносахариди у лігноцелюозній біомасі. Незважаючи на те, що існує велика кількість бактерій і дріжджів, які здатні природним шляхом утилізувати ксилозу [11—13], клітини *S. cerevisiae* мають ряд переваг — стійкість до високого осмотичного тиску, низьких значень рН, високих концентрацій спиртів та до дії інгібіторів лігноцелюозних гідролізатів [14].

На сьогодні *S. cerevisiae* — це широко вивчена на клітинному та молекулярному рівні модельна еукаріотична система, при роботі з якою можна використовувати велику кількість доступних генетичних інструментів [15], тому **метою пропонованого огляду** є аналіз сучасної наукової літератури останніх років щодо отримання етанолу, бутанолу та ізобутанолу з використанням генетично модифікованих клітин *S. cerevisiae*.

**Викладення основних результатів дослідження.** Етанол. Біоетанол є екологічно чистим автомобільним паливом, яке можна використовувати окремо або в суміші з бензином. Він має ряд переваг: високе октанове число, широкий температурний діапазон займання, нетоксичний, може легко розкладатись мікроорганізмами [16]. Використання сільськогосподарських культур як джерела для отримання біоетанолу на сьогодні не є актуальним, оскільки на цей процес витрачається велика кількість сировини, яку потрібно вирощувати на великих площах тривалий час. Тому лігноцелюозна сировина, яка є відходами сільського господарства та деревопереробної промисловості, є перспективним поновлювальним джерелом для отримання біоетанолу [17].

Лігноцелюлоза складається з таких полісахаридів, як целюлоза і геміцелюлоза, а також ароматичного полімеру лігніну. Для ефективного використання лігноцелюлози необхідне швидке та повне споживання її цукрів, тобто має відбуватись біоконверсія ксилану, ксилоолігоцукрів і целюлози. Зазвичай, ксилан геміцелюлози розщеплюється на ксилоолігоцукри ендо- $\beta$ -ксиланазою, після чого  $\beta$ -ксилозидаза розкладає ксилоолігоцукри до ксилози [18]. Для того, щоб у процесі біосинтезу отримати високі концентрації етанолу, дріжджі *S. cerevisiae* повинні використовувати всі цукри, що містяться в середовищі. Проте проблема полягає в тому, що сахароміцети не здатні споживати ксилозу [19].

Для здійснення катаболізму ксилози клітини *S. cerevisiae* модифікують, використовуючи такі гетерологічні шляхи, як ксилоредуктазно-ксилітолдегідрогеназний (КР-КДР) або ксилозоізомеразний (КІ) [20]. При використанні шляху КР-КДР спостерігається окисно-відновний дисбаланс, оскільки відновлення ксилози до ксилітолу каталізується за допомогою ксилоредуктази з використанням NADPH, а окислення ксилітолу в ксилулозу каталізується ксилітолдегідрогеназою з використанням NAD<sup>+</sup>, що призводить до накопичення ксилітолу та зменшення концентрації етанолу. З іншого боку, проміжний продукт не утворюється

при використанні КІ шляху, оскільки ксилоза безпосередньо метаболізується в ксилулозу, але швидкість споживання ксилози в рекомбінантних штамів, що мають шлях КІ, значно нижча, ніж у штамів зі шляхом КР-КДР [21].

Використовуючи гетерологічний шлях КР-КДР, було модифіковано ряд сахароміцетів. Лі зі співавт. виділили з *Orpinomyces* sp. та *Prevotella ruminicola* ген  $\beta$ -ксилозидази й експресували у *S. cerevisiae* Alpha25, що дало змогу одержати на середовищі з ксилозою 13 г/л етанолу [22]. Із *Penicillium oxalicum* був виділений ген  $\beta$ -ксилозидази (*xyl3A*). Цей фермент перетворює ксилоолігосахариди в ксилузу з подальшим утворенням етанолу на лігноцеллолозних відходах. У результаті генетичної модифікації геном *xyl3A* *S. cerevisiae* були отримані рекомбінантні штами BSPX042, BSGO, BSGBX, BSGMBX, BSGIBX, BSGPBX, BSGSBX. Найвища концентрація етанолу спостерігалась при культивуванні штаму *S. cerevisiae* BSGIBX [23].

Триває пошук нових джерел генів ксилозоізомерази, які можна було б інтегрувати у геном дріжджів. Використовуючи гени КІ *Reticulitermes speratus*, які було виділено з термітів, дослідники створили рекомбінантні дріжджі *S. cerevisiae* WR311. Штам характеризується підвищеною здатністю до утилізації ксилози [24].

Конструювання дріжджів, які здатні одночасно зброджувати змішані цукри лігноцеллолозних матеріалів, є основним завданням при оптимізації виробництва біоетанолу. Wang зі співавт. створили штам *S. cerevisiae* BSW4XA3, здатний до одночасного споживання D-глюкози, D-ксилози і L-арабінози. Сконструйований штам характеризувався підвищеним споживанням змішаних цукрів і виходом етанолу під час культивування [25].

При культивуванні дріжджів на середовищі з ксилозою і глюкозою споживання ксилози розпочинається лише після повного катаболізму глюкози. Тому при конструюванні рекомбінантних дріжджів, у яких функціонує гетерологічний шлях КІ, необхідно вдосконалити систему поглинання і катаболізму ксилози за одночасної наявності глюкози в середовищі культивування. Нещодавно створено штам *S. cerevisiae* CW9, в клітині якого інтегровано гени ксилозоізомерази разом із білками гексозних транспортерів. У результаті культивування цього штаму вихід етанолу становив 90% від теоретично розрахованого [26].

При ферментативному гідролізі целюлози утворюється целобіоза — дисахарид глюкози. Дія на целобіозу  $\beta$ -глюкозидази призводить до вивільнення глюкози, яка спричиняє катаболітну репресію ксилози в процесі культивування [27]. Природні штами *S. cerevisiae* не зброджують целобіозу. Існують також два підходи до конструювання дріжджів, які будуть здатні засвоювати целобіозу. Перший — експресія гетерологічних генів, що кодують транспортер целобіози і  $\beta$ -глюкозидази, яка каталізує гідроліз целобіози до двох молекул глюкози, що далі фосфорилуються до глюкозо-6-фосфату. Другий — скоординована експресія транспортера целобіози і целобіозофосфорилази, яка використовує неорганічний фосфат для гідролізу целобіози, при цьому утворюється глюкоза і глюкозо-1-фосфат [28]. Американськими вченими створено штам *S. cerevisiae* BF3645, в якому функціонують гени ксилозоізомерази, двох транспортерів целобіози і целобіозофосфорилази, за допомогою яких цей штам здатний до коферментації ксилози і целобіози з утворенням етанолу в анаеробних умовах [29].

Ведуться роботи з конструювання сахароміцетів не лише з високим метаболічним потенціалом для ферментації ксилози, а й з високою стійкістю до дії

інгібіторів (органічні кислоти, фурани, феноли тощо), що наявні в лігноцелюлозних гідролізатах. Так, сконструйовано штам *S. cerevisiae* NAPX37, який може швидко метаболізувати ксилозу у високих концентраціях (75 г/л) під час періодичного та безперервного культивування. Клітини цього штаму стійкі до дії оцтової, мурашиної та левулінової кислот, що наявні в лігноцелюлозних гідролізатах [30].

У табл. 1 наведено узагальнену інформацію щодо рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*, які здатні синтезувати етанол, використовуючи як джерела вуглецю різні цукри лігноцелюлозної сировини.

*Таблиця 1. Синтез етанолу рекомбінантними штамми Saccharomyces cerevisiae*

Штам	Експресовані гени	Джерело вуглецю	Тривалість культивування, год	Вихід етанолу, г/г цукрів	Концентрація етанолу, г/л	Джерело
1	2	3	4	5	6	7
BSW4XA3	D-ксилозоізомерази ( <i>XI</i> ), D-ксилозоредуктази ( <i>XR</i> ), ксилітолдегідрогенази ( <i>XDH</i> ), ксилулокінази ( <i>XK</i> )	D-глюкоза, D-ксилоза, L-арабіноза	120	0,35	12	[25]
Alpha25	$\beta$ -ксилозидази ( <i>xyIA</i> )	Ксилоза	48	0,31	13	[22]
NAPX37	Ксилоредуктази ( <i>XYL1</i> ), ксилітдегідрогенази ( <i>XYL2</i> ), ксилулокінази ( <i>XKS1</i> ), $\beta$ -глюкозидази ( <i>BGL1</i> )	Ксилоза, глюкоза	36	0,39	13,5	[30]
YRH1114	D-ксилозоізомерази ( <i>XI</i> ), D-ксилулокінази ( <i>XK</i> )	D-ксилоза	91	0,04	13,6	[31]
BP10001	Ксилоредуктази ( <i>XR</i> ), ксилітдегідрогенази ( <i>XDH</i> ), ксилулозокінази ( <i>XK</i> )	Ксилоза	120	0,35	14	[32]
DLG-K1T7 (HXT7)	Ксилоредуктази ( <i>XYL1</i> ), ксилітдегідрогенази ( <i>XYL2</i> ), ксилулокінази ( <i>XKS1</i> )	Глюкоза, ксилоза	36	0,38	15	[33]
39a (Bvu)	Ксилозоізомерази ( <i>XI</i> )	Ксилоза	24	0,36	16,7	[34]
SyBE003	Ксилозоізомерази ( <i>XyIA</i> ), ксилулокінази ( <i>XKS1</i> )	Ксилоза	36	0,43	18	[35]
BSGIBX	Ксилозоізомерази (Ru- <i>xyIA</i> ) та $\beta$ -ксилозидази ( <i>xyIA</i> )	Глюкоза, ксилоза	48	0,47	19,4	[23]
WR311	Ксилозоізомерази ( <i>XI</i> )	ксилоза	72	0,40	21	[24]
K7-XYL	Альдозоредуктази ( <i>GRE3</i> ), сорбітолдегідрогенази ( <i>SOR1</i> ), ксилулозокінази ( <i>XKS1</i> )	Ксилоза	72	0,37	37,6	[36]
BF3645	Ксилозоізомерази ( <i>RfCO</i> ), целобіозофосфорилази ( <i>FD-1</i> ), ксилулокінази ( <i>XKS1</i> )	Глюкоза, ксилоза, целобіоза	96	0,44	48,6	[29]
CW9	Ксилозоізомерази ( <i>XI</i> )	Глюкоза, ксилоза	72	0,45	54	[26]

При використанні лігноцелюлози як субстрату для виробництва бутанолу виникає необхідність її попередньої обробки з метою руйнування щільної структури й оцукрювання. Для цього використовують фізичні, хімічні та біологічні методи. У процесі попередньої обробки лігноцелюлозної сировини фізичними чи хімічними методами утворюється велика кількість токсичних сполук, які є інгібіторами мікробної ферментації [37]. При цьому дріжджі *S. cerevisiae* є стійкими до токсичної дії інгібіторів, що утворюються при попередній обробці лігноцелюлозної сировини парою [38].

Створено штам *S. cerevisiae* D5A<sup>+</sup>, в клітини якого введено ген ксилосоізомерази *Bacteroides thetaiotaomicron*. Ці сахароміцети здатні використовувати як субстрати для синтезу етанолу попередньо оброблену парою солому тритикале та макуху солодкого сорго. При вказаному способі обробки утворюються такі токсичні для клітин побічні продукти, як оцтова кислота, фурфурол та 5-гідроксиметилфурфурол. Клітини штаму D5A<sup>+</sup> є стійкими до цих інгібіторів [39].

*S. cerevisiae* XUSEA синтезує рекомбінантну ксилосоізомеразу, що опосередковує одностадійну реакцію ізомеризації, в якій ксилоза перетворюється в ксилулозу. Також вказаний штам здатний до коферментації глюкози і ксилози. Показано, що при підвищенні температури культивування *S. cerevisiae* XUSEA на середовищі з гідролізатом міскантуса з 30 до 33°C швидкість споживання ксилози збільшується на 44%, а синтез етанолу — на 23%, що призводить до виходу етанолу 0,48 г/г цукрів [40].

Рекомбінантні клітини *S. cerevisiae* STXQ також здатні до коферментації глюкози і ксилози. При культивуванні цього штаму на середовищі з гідролізатом пустих залишків пальмових фруктів без процесу детоксикації для видалення інгібіторів спостерігали споживання цукрів на рівні 94%. При цьому вихід етанолу склав 0,42 г/г цукрів [41].

У рекомбінантних дріжджах при використанні шляху КР-КДР спостерігається окисно-відновний дисбаланс, що призводить до накопичення ксилітолу та зменшення концентрації етанолу. Тому в клітини *S. cerevisiae* JX123\_poxE був введений ген NADH-оксидази *Lactococcus lactis*. У результаті синтез побічного продукту ксилітолу при культивуванні цього штаму на середовищі з гідролізатом міскантусу зменшився на 48%, а вихід етанолу становив 0,43 г/г цукрів [4].

Гідролізати лігноцелюлозної сировини, крім ксилози, містять у великій кількості арабінозу. Тому з метою синтезу етанолу на лігноцелюлозних субстратах сконструйовано штам *S. cerevisiae* 36aS1.10.4. Ці дріжджові клітини містять гени *Lactobacillus plantarum*, що кодують ферменти утилізації арабінози, а також гени ксилосоізомерази. Показано здатність клітин штаму 36aS1.10.4 до одночасного споживання глюкози і ксилози та до продукції етанолу у високій концентрації на лігноцелюлозних гідролізатах [5].

Узагальнену інформацію щодо можливості культивування рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* на середовищі із різними гідролізатами лігноцелюлозної сировини з метою отримання етанолу наведено у табл. 2.

Таблиця 2. Гідролізати лігноцелюлозної сировини як субстрати для синтезу етанолу модифікованими дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*

Штам	Лігноцелюлозна сировина	Тривалість культивування, год	Концентрація етанолу, г/л	Джерело
D5A <sup>HN</sup>	Макуха солодкого сорго	150	19,2	[39]
BADE <sub>1</sub>	Солома кукурудзи	48	26,1	[42]
STXQ	Пусті залишки пальмових фруктів	72	28,4	[41]
XUSEA	Міскантус	48	30,1	[40]
36aS1.10.4	Пусті залишки пальмових фруктів	72	50,3	[5]
	Солома пшениці	46	54,1	
JX123 поxE	Міскантус	48	55,5	[4]

**Бутанол.** Порівняно з етанолом бутанол має ряд переваг: вища температура кипіння, менша гігроскопічність, менша корозійна активність, більш високе октанове число. Також слід відзначити, що використання бензину, змішаного з бутанолом, призводить до зменшення викидів вихлопних газів [43].

Природними продуцентами бутанолу є бактерії роду *Clostridium*. Недоліком їх використання є низька швидкість росту, утворення спор, низька стійкість до бутанолу, утворення побічних продуктів, також ці бактерії є строгими анаеробами. Тому увагу дослідників привертають інші мікроорганізми, які широко використовуються в промислових масштабах, зокрема дріжджі *S. cerevisiae* (табл. 3). При конструюванні здатних до продукції бутанолу рекомбінантних клітин *S. cerevisiae* найчастіше використовують дві стратегії: гетерологічна експресія генів *Clostridium* або поглинання амінокислот [44].

Таблиця 3. Генетично модифіковані штами *Saccharomyces cerevisiae* — продуценти бутанолу

Штам	Шлях синтезу бутанолу	Тривалість культивування, год	Концентрація бутанолу, мг/л	Джерело
VSY10	Зворотне β-окислення (шлях ацетил-КоА)	74	130	[45]
COM	Синергічний шлях (треоніновий і цитрамалатовий)	96	835	[46]
W303-1A	Два паралельні шляхи (гетерологічний шлях експресії генів <i>Clostridium</i> і ендегенний за рахунок делеції гену алкогольдегідрогенази ( <i>ADH<sub>1</sub></i> ))	312	2400	[6]

Вихідним субстратом бутанольного шляху є ацетил-кофермент А (ацетил-КоА), а більшість проміжних продуктів пов'язана з коферментом А (КоА). Тому у штамі *S. cerevisiae* VSY10 збільшено синтез КоА за рахунок надекспресії гену пантотенаткінази (*coaA*) *Escherichia coli*. А шляхом делеції генів алкогольдегідрогенази (*ADH1-5*) і гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (*GPD2*) вдалось збільшити доступність ацетальдегіду і NADH як рушійних факторів для шляху бутанолу [45].

Ключовий проміжний продукт ендегенного шляху синтезу бутанолу α-кетобутират може бути синтезований шляхом катаболізму треоніну. Іншим способом

отримання  $\alpha$ -кетобутирату є шлях від пірувату й ацетил-КоА через цитрамалат-синтазу. Використовуючи методи метаболічної інженерії, створено штам *S. cerevisiae* COM, у клітинах якого оптимізовано синергічний шлях синтезу бутанолу — шлях ендogenousного треоніну, і введений шлях цитрамалату. При цьому синтез бутанолу збільшився в 7 разів порівняно з вихідним немодифікованим штамом дріжджів [46].

При дослідженні шляхів синтезу бутанолу рекомбінантним штамом *S. cerevisiae* W303-1A була висунута гіпотеза про те, що гліцин перетворюється в гліоксилат, який далі конденсується з бутирил-КоА в 3-етилмалат. Після чого 3-етилмалат перетворюється в  $\alpha$ -кетовалерат, а потім у бутанол. Використання  $\alpha$ -кетовалерата як попередника в середовищі для культивування дріжджів призвело до збільшення концентрації бутанолу [6].

*Ізобутанол.* Цей спирт вважають біопаливом наступного покоління, який може замінити дизельне паливо. Нині проводяться дослідження використання ізобутанолу в суміші з дизельним паливом. При цьому спостерігають збільшення термічного ККД гальм на 3% та зменшення викидів продуктів горіння (оксиди азоту, чадний газ) на 60% [47].

Основні реакції для отримання ізобутанолу включають синтез 2-кетозовалерату, що є проміжним продуктом біосинтезу валіну в мітохондріях і його подальше перетворення в ізобутанол через шлях Ерліха в цитоплазмі. Тобто ізобутанол є побічним продуктом синтезу валіну в *S. cerevisiae*. Для збільшення синтезу ізобутанолу конструюють рекомбінантні штами дріжджів (табл. 4), використовуючи при цьому такі шляхи: переміщення ферментів, що відповідають за продукцію ізобутанолу в один і той же внутрішньоклітинний компартмент; видалення конкурентного шляху для направлення потоку до побічних продуктів; усунення дисбалансу кофакторів [48].

Таблиця 4. Синтез ізобутанолу штамми *Saccharomyces cerevisiae*

Рекомбінантний штам	Тривалість культивування, год	Вихід ізобутанолу, мг/г глюкози	Концентрація ізобутанолу, мг/л	Джерело
YTD306	120	6,6	143	[49]
JHY433	120	15	377	[50]
Isoy8	90	15	630	[51]
BSW205	24	16	1620	[7]
JWY23	96	59,55	2090	[8]

Рекомбінантний штам *S. cerevisiae* Isoy8 модифікований таким чином, що в дріжджових клітинах ферменти біосинтезу валіну функціонують не в мітохондріях, а в цитоплазмі. При цьому збільшення синтезу ізобутанолу спостерігалось при відсутності валіну і в середовищі культивування [49].

У клітини *S. cerevisiae* YTD306 введено гени декарбоксилази 2-кетокислот і алкогольдегідрогенази для посилення ендogenousної активності шляху Ерліха. Також введено ген *Ilv2*, що каталізує першу стадію синтезу валіну і видалено ген піруватдекарбоксилази. В результаті був збільшений синтез ізобутанолу модифікованими клітинами в 13 разів [47].

Блокуючи шляхи біосинтезу 2,3-бутандіолу, пантотенату, лейцину і ізолейцину, дослідники оптимізували й збільшили метаболічний потік у бік синтезу ізобутанолу в *S. cerevisiae* JWY04. В клітинах штаму JWY19 збільшено синтез ізобутанолу за рахунок пригнічення реакцій поглинання пірувату й регенерації



NAD<sup>+</sup> у шляхах біосинтезу етанолу та гліцерину. Синтез ізомасляної кислоти з ізобутиральдегіду також конкурує з продукцією ізобутанолу. Тому в *S. cerevisiae* JWY23 видалено ген *Ald6*, що кодує синтез альдегіддегідрогенази, при цьому спостерігається зменшення синтезу ізомасляної кислоти на 80% та збільшення синтезу ізобутанолу на 40% [8].

### **Висновки**

Отже, при конструюванні рекомбінантних клітин *S. cerevisiae* використовують різні підходи, щоб збільшити концентрацію і вихід цільового продукту, створити стійкі до дії інгібіторів штами, а також розширити діапазон споживання субстрату. Перспективним є створення дріжджових продуцентів етанолу, що можуть використовувати лігноцелюлозну сировину. Оскільки природні штами *S. cerevisiae* не здатні до споживання ксилози, використовують кілька генетичних стратегій для конструювання сахароміцетів, які можна культивувати на середовищах з цим джерелом вуглецю. Ведуться роботи зі створення рекомбінантних *S. cerevisiae*, які здатні синтезувати бутанол, але, порівняно з бактеріальними системами експресії, гетерологічний синтез цього виду палива у сахароміцетів є дуже низьким. Оскільки ізобутанол може стати біопаливом наступного покоління, яке можна отримувати за допомогою мікроорганізмів, ведуться дослідження з генетичної модифікації *S. cerevisiae* з метою отримання високих концентрацій вказаного продукту.

### **Література**

1. Alfonzo A., Francesca N., Matraxia M., Craparo V., Naselli V., Mercurio V., Moschetti G. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to racemes of Grillo grape variety. *FEMS Microbiol. Lett.* 2020, 367(12): fnaa079. doi: 10.1093/femsle/fnaa079.
2. Pauley M., Maskell D. Mini-review: the role of *Saccharomyces cerevisiae* in the production of gin and vodka. *Beverages.* 2017, 3: 13. doi: 10.3390/beverages3010013.
3. Elghandour M., Tan Z., Abu Hafsa S., Adegbeye M., Greiner R., Ugbogu E., Cedillo Monroy J., Salem A. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *J. Appl. Microbiol.* 2020, 128: 658—674. doi: 10.1111/jam.14416.
4. Lee Y. G., Jin Y. S., Cha Y. L., Seo J. H. Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 2017, 228: 355—361. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.042.
5. Huang S., Liu T., Peng B., Geng A. Enhanced ethanol production from industrial lignocellulose hydrolysates by a hydrolysate-cofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2019, 42(5): 883—896. doi: 10.1007/s00449-019-02090-0.
6. Swidah R., Ogunlabi O., Grant C. M., Ashe M. P. n-Butanol production in *S. cerevisiae*: coordinate use of endogenous and exogenous pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102(22): 9857—9866. doi: 10.1007/s00253-018-9305-x.
7. Matsuda F., Ishii J., Kondo T., Ida K., Tezuka H., Kondo A. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance. *Microb. Cell.* 2013, 12: 119. doi: 10.1186/1475-2859-12-119.
8. Wess J., Brinek M., Boles E. Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation. *Biotechnol. Biofuels.* 2019, 12(1): 173. doi: 10.1186/s13068-019-1486-8.
9. Norouzi N., Fani M., Ziarani Z. K. The fall of oil age: a scenario planning approach over the last peak oil of human history by 2040. *J. Petrol. Sci. Eng.* 2020, 188: 106827. doi: 10.1016/j.petrol.2019.106827.
10. Ko J. K., Lee J. H., Jung J. H., Lee S.-M. Recent advances and future directions in plant and yeast engineering to improve lignocellulosic biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2020, 134: 110390. doi: 10.1016/j.rser.2020.110390.

11. Xin F., Chen T., Jiang Y., Dong W., Zhang W., Zhang M., Wu H., Ma J., Jiang M. Strategies for improved isopropanol-butanol production by a *Clostridium* strain from glucose and hemicellulose through consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Biofuels*. 2017, 10. doi: 10.1186/s13068-017-0805-1.
12. Rodrussamee N., Lertwattanasakul N., Hirata K., Suprayogi, Limtong S., Kosaka T., Yamada M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 90: 1573—1586. doi: 10.1007/s00253-011-3218-2.
13. Kostas E. T., White D. A., Du C., Cook D. J. Selection of yeast strains for bioethanol production from UK seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 2016, 28: 1427—1441. doi: 10.1007/s10811-015-0633-2.
14. Auesukaree C., Damnernsawad A., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Boonchird C., Kaneko Y., Harashima S. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Genet.* 2009, 50: 301-310. doi: 10.1007/BF03195688.
15. Lian J., Mishra S., Zhao H. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications. *Metab. Eng.* 2018, 50: 85—108. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.011.
16. Azhar S. H. M., Abdulla R., Jambo S. A., Marbawi H., Gansau J. A., Faik A. A. M., Rodrigues K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. *Biochem. Biophys. Rep.* 2017, 10: 52—61. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003.
17. Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A. S., Hatziloukas E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol.* 2020, 6(1): 1. doi: 10.3934/microbiol.2020001.
18. Li H., Shen Y., Wu M., Hou J., Jiao C., Li Z., Liu X., Bao X. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. *Bioresour. Bioprocess.* 2016, 3(1): 51. doi: 10.1186/s40643-016-0126-4.
19. Cheng C., Tang R. Q., Xiong L., Hector R. E., Bai F. W., Zhao X. Q. Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose-utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*. 2018, 11(1): 1—19. doi: 10.1186/s13068-018-1018-y.
20. Hoang P. T. N., Ko J. K., Gong G., Um Y., Lee S. M. Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain for lignocellulosic biofuel production. *Biotechnol. Biofuels*. 2018, 11: 268. doi: 10.1186/s13068-018-1269-7.
21. Demeke M. M., Dietz H., Li Y., Foulquie-Moreno M.R., Mutturri S., Deprez S., Abt T. D., Bonini B. M., Liden G., Dumortier F., Verplaetse A., Boles E., Thevelein J. M. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels*. 2013, 6: 89. doi: 10.1186/1754-6834-6-89.
22. Li Y. C., Xie C. Y., Yang B. X., Tang Y. Q., Wu B., Sun Z. Y., Xia, Z. Y. Comparative transcriptome analysis of recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains with different xylose utilization pathways. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019, 189: 1007—1019. doi: 10.1007/s12010-019-03060-8.
23. Niu Y., Wu L., Shen Y., Zhao J., Zhang J., Yi Y., Bao X. Coexpression of  $\beta$ -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xylo-oligosaccharides. *Cellulose*. 2019, 26: 7923-7937. doi: 10.1007/s10570-019-02650-3.
24. Katahira S., Muramoto N., Moriya S., Nagura R., Tada N., Yasutani N., Tokuhiro K. Screening and evolution of a novel protist xylose isomerase from the termite *Reticulitermes speratus* for efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*. 2017, 10: 203. doi: 10.1186/s13068-017-0890-1.
25. Wang C., Zhao J., Qiu C., Wang S., Shen Y., Du B., Bao X. Coutilization of d-glucose, d-xylose, and l-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae* by coexpressing the metabolic pathways and evolutionary engineering. *BioMed Res. Int.* 2017: 5318232. doi: 10.1155/2017/5318232.
26. Zhang M., Fan W. J., Wang J. Y., Cao L. M. Optimized xylose isomerase uptake and expression level in *Saccharomyces cerevisiae* for improving ethanol production. *Appl. Environ. Biotechnol.* 2018, 3(1): 47—52. doi: 10.26789/AEB.2018.01.007.
27. Li S., Du J., Sun J., Galazka J. M., Glass N. L., Cate J. H., Yang X., Zhao H. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a  $\beta$ -

glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biosyst.* 2010, 6(11): 2129—2132. doi: 10.1039/c0mb00063a.

28. Sadie C. J., Rose S. H., Den Haan R., Van Zyl W. H. Coexpression of a cellobiose phosphorylase and lactose permease enables intracellular cellobiose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 90(4): 1373—1380. doi: 10.1007/s00253-011-3164-z.

29. Aeling K. A., Salmon K. A., Laplaza J. M., Li L., Headman J. R., Hutagalung A. H., Picataggio S. Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.* 2012, 39(11): 1597—1604. doi: 10.1007/s10295-012-1169-y.

30. Li Y. C., Mitsumasa K., Gou Z. X., Gou M., Tang Y. Q., Li G. Y., Kida K. Xylose fermentation efficiency and inhibitor tolerance of the recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain NAPX37. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100(3): 1531—1542. doi: 10.1007/s00253-015-7167-z.

31. Hector R. E., Dien B. S., Cotta M. A., Mertens J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. *Biotechnol. Biofuels.* 2013, 6(1): 84. doi: 10.1186/1754-6834-6-84.

32. Klimacek M., Kirl E., Krahulec S., Longus K., Novy V., Nidetzky B. Stepwise metabolic adaption from pure metabolization to balanced anaerobic growth on xylose explored for recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2014, 13(1): 37. doi: 10.1186/1475-2859-13-37.

33. Goncalves D. L., Matsushika A., Belisa B., Goshima T., Bon E. P., Stambuk B.U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme Microb. Technol.* 2014, 63: 13-20. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.05.003.

34. Peng B., Huang S., Liu T., Geng A. Bacterial xylose isomerases from the mammal gut Bacteroidetes cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. *Microb. Cell Fact.* 2015, 14: 70. doi: 10.1186/s12934-015-0253-1.

35. Qi X., Zha J., Liu G. G., Zhang W., Li B. Z., Yuan Y. J. Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 2015, 6: 1165. doi: 10.3389/fmicb.2015.01165.

36. Konishi J., Fukuda A., Mutaguchi K., Uemura T. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes. *Biotechnol. Lett.* 2015, 37(8): 1623—1630. doi: 10.1007/s10529-015-1840-2.

37. Скроцька О. І., Пирог Т. П., Скроцький С. О. Лігноцелюлозні відходи як сировина для синтезу бутанолу кластридіями. *Наукові праці НУФТ.* 2019, 25(1): 16—32. doi: 10.24263/2225-2924-2019-25-1-4.

38. Almeida J., Modig T., Petersson A., Hahn-Hagerdal B., Liden G, Gorwa-Grauslund M. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007, 82: 340—349. doi: 10.1002/jctb.1676.

39. Smith J., van Rensburg E., Gorgens J. F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. *BMC Biotechnol.* 2014, 14: 41. doi: 10.1186/1472-6750-14-41.

40. Tran P. H. N., Ko J. K., Gong G., Um Y., Lee S. M. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. *Biotechnol. Biofuels.* 2020, 13: 12. doi: 10.1186/s13068-019-1641-2.

41. Liu T., Huang S., Geng A. Recombinant diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain development for rapid glucose and xylose co-fermentation. *Fermentation.* 2018, 4(3): 59. doi: 10.3390/fermentation4030059.

42. Zhang M. M., Xiong L., Tang Y. J., Mehmood M. A., Zhao Z. K., Bai F. W., Zhao X. Q. Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the de novo purine biosynthesis genes. *Biotechnol. Biofuels.* 2019, 12: 116. doi: 10.1186/s13068-019-1456-1.

43. Nawab S., Wang N., Ma X., Huo Y. X. Genetic engineering of non-native hosts for 1-butanol production and its challenges: a review. *Microb. Cell Fact.* 2020, 19: 79. doi: 10.1186/s12934-020-01337-w.

44. Azambuja S. P. H., Goldbeck R. Butanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: perspectives, strategies and challenges. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2020, 36: 48. doi: 10.1007/s11274-020-02828-z.

45. Schadoweg V., Boles E. n-Butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl-CoA. *Biotechnol. Biofuels*. 2016, 9: 44. doi: 10.1186/s13068-016-0456-7.
46. Shi S., Si T., Liu Z., Zhang H., Ang E. L., Zhao H. Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 2016, 6: 25675. doi: 10.1038/srep25675.
47. Ashok B., Nanthagopal K., Saravanan B., Azad K., Patel D., Sudarshan B., Ramasamy R. A. Study on isobutanol and *Calophyllum inophyllum* biodiesel as a partial replacement in CI engine applications. *Fuel*. 2019, 235: 984—994. doi: 10.1016/j.fuel.2018.08.087.
48. Kuroda K., Ueda M. Cellular and molecular engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biobutanol production. *FEMS Microbiol. Lett.* 2016, 363 (3): fnv247. doi: 10.1093/femsle/fnv247.
49. Kondo T., Tezuka H., Ishii J., Matsuda F., Ogino C., Kondo A. Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 2012, 159(1—2): 32—37. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.01.022.
50. Park S. H., Kim S., Hahn J. S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98(21): 9139—9147. doi: 10.1007/s00253-014-6081-0.
51. Brat D., Weber C., Lorenzen W. Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 2012, 5: 65. doi: 10.1186/1754-6834-5-65.