

**СЕЛЕКЦІЯ МУТАНТІВ ДРІЖДЖІВ *SCHEFFERSOMYCES STIPITIS*
ЗІ ЗМІНЕНОЮ ЗДАТНІСТЮ ДО АЛКОГОЛЬНОЇ ФЕРМЕНТАЦІЇ ГЛЮКОЗИ
ТА КСИЛОЗИ МЕТОДОМ ІНСЕРЦІЙНОГО МУТАГЕНЕЗУ**

М. Борбуляк, О. Гринів, Л. Дацюк, К. Дмитрук

*Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна
e-mail: borbulyak_m@ukr.net*

M. Borbuliak, O. Hryniv, K. Dmytruk, L. Datsyuk. SELECTION OF THE YEAST *SCHEFFERSOMYCES STIPITIS* WITH MODIFIED ABILITY TO ALCOHOL FERMEN- TATION OF GLUCOSE AND XYLOSE USING METHOD OF INSERTION MUTAGE- NESIS. In our study we propose a strategy for the direct selection of the yeast strains producing higher amounts of ethanol. It was established that the small molecule 3-bromopyruvate specifically inhibits key enzymes of glycolysis: hexokinase, pyruvate kinase and pyruvate decarboxy- lase. The yeast cells resistant to 3-bromopyruvate should intensify glycolysis. It will stimulate synthesis of ethanol during the fermentation. Insertional mutant *S. stipitis* #4.6 is characterized by elevated amount of ethanol produced from glucose or xylose. Complementation mutant *S. stipitis* *Comp_TMI1* produces similar amount of ethanol to a wild type strain.

Світова ситуація з енергоносіями на сьогоднішній день виглядає доволі загрозливо. Ціни на викопне паливо, особливо на нафту, запаси якої постійно зменшуються, є вкрай не- стабільними. Саме тому у світі дедалі більша увага приділяється пошуку шляхів викорис- тання енергоресурсів поновлювальної енергії, накопиченої живою речовиною, зокрема, рослинною біомасою, яка є потенційно невичерпним джерелом рідкого палива – етанолу. На сьогодні найефективнішим способом отримання етанолу з рослинної сировини (ліг- ноцелюлози) вважається одночасний ферментативний гідроліз целюлози і геміцелюлози з подальшою ферментацією отриманих вільних цукрів до етанолу.

Метою даної роботи була розробка методу позитивної селекції дріжджів *Scheffersomyces stipitis* з підвищеним рівнем алкогольної ферментації глюкози та ксилози. На початкових етапах шляхом трансформації компетентних клітин штаму дріжджів *PJH53 S. stipitis* інсерційною касетою *pUC19_HIS3* було отримано серію мутантів з відновленою прототрофністю за гістидином і резистентністю до селективного агента 3-бромпірувату. Токсичний для дріжджових клітин аналог пірувату, 3-бромпіруват, здатний специфічно ін- гібувати ключові ферменти гліколізу: гексокіназу, піруваткіназу та піруватдекарбоксилазу. Дріжджові штами, резистентні до 3-бромпірувату, найімовірніше, матимуть посилений гліколіз, що стимулюватиме синтез етанолу під час алкогольної ферментації. Серед про- аналізованих інсерційних мутантів дріжджів *S. stipitis* було відібрано інсерційний мутант #4.6, у якого був підвищений рівень алкогольної ферментації ксилози у 2 рази, та глюкози в 1,5 рази на 72 години при температурі 30 °C порівняно з вихідним штамом. Для визначення сайту інсерції вектора в геном мутанта та імовірного гена, експресія якого була змінена внаслідок інтеграції, інсерційну касету із частиною фланкуючої ділянки було виділено із геному мутанта #4.6. Фланкуючі ділянки було секвеновано та виявлено, що касета інтегру- валася у відкриту рамку зчитування гена, гомологічного до гена *YDL119C Saccharomyces cerevisiae*, що кодує мітохондріальний транспортер. Ми запропонували умовно назвати цей ген *TMI1* (Transport in Mitochondria).

На основі інсерційного штаму #4.6 сконструйовано мутант *S. stipitis* з комплемен- тацією гена *TMI1*. Встановлено, що даний штам під час алкогольної ферментації глюкози або ксилози синтезує таку ж кількість етанолу, як штам дикого типу і менше, ніж інсерційний штам #4.6. Це свідчить про те, що ген *TMI1* є прямим або опосередкованим фактором ре- гуляції метаболізму й алкогольної ферментації ксилози та глюкози.