



УКРАЇНА

(19) UA (11) 77386 (13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 15/09

C12N 1/16

C12P 7/40

C12R 1/645 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИРОБЛЕННЯ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ

1

(21) 2001128866

(22) 19.05.2000

(24) 15.12.2006

(86) PCT/US00/13907, 19.05.2000

(31) 09/316,490

(32) 21.05.1999

(33) US

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Раджгархія Вініт, US, Хатзіманікатіс Васілій, US, Олсон Стейсі, US, Карлсон Тінг Ліу, US, Старр Джон Н., US, Колстад Джеффрі Дж., US, Ійал Аарон, IL

(73) КАРГІЛЛ ДОУ ЛПС, US

(56) WO 9914335 A, 25.03.1999

EP 0370 160 A, 30.05.1990

Porro d et al. (01.05.1995), BIOTECHNOLOGY PROGRESS 11, pages 294-298

(57) 1. Спосіб вироблення молочної кислоти, що включає у себе:

а) надання Кребтрі-негативного мікроорганізму, вибраного з групи, що складається з *Kluuyveromyces*, *Pichia* та *Hansenula*, який проявляє інгібування споживання кисню при культивуванні в аеробних умовах через наявність високої концентрації глюкози та трансформацією хоча б одного екзогеназного гена, що кодує лактатдегідрогеназу;

б) культивування Кребтрі-негативного мікроорганізму у першому культуральному середовищі, яке містить джерело вуглецю, включаючи глюкозу, та у перших аеробних умовах культивування, які стимулюють клітинне дихання, і

с) подальше культивування Кребтрі-негативного мікроорганізму у культуральному середовищі, яке містить джерело вуглецю, включаючи глюкозу, у других анаеробних умовах культивування, що стимулюють вироблення молочної кислоти.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що другі умови культивування включають у себе інгібітор клітинного дихання.

3. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що вміст розчиненого кисню у першому культуральному середовищі складає принаймні 20 % відносно його кількості за насичених умов культивування у повітрі при атмосферному тиску.

2

4. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що вміст розчиненого кисню у другому культуральному середовищі складає менше ніж 2 % відносно його кількості за насичених умов культивування у повітрі при атмосферному тиску.

5. Спосіб за п. 4, який відрізняється тим, що на етапі б) вміст розчиненого кисню у першому культуральному середовищі складає принаймні 50 % відносно його кількості за насичених умов культивування у повітрі при атмосферному тиску.

6. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, друге культуральне середовище має величину рН, більшу ніж 1,5.

7. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що мікроорганізм, що проявляє Кребтрі-негативний фенотип, вибирають з групи, що складається з *Kluuyveromyces thermotolerans*, *Kluuyveromyces lactic* та *Kluuyveromyces marxianus*.

8. Спосіб за п. 7, який відрізняється тим, що вміст розчиненого кисню у першому культуральному середовищі складає більше ніж 20 % відносно його кількості за насичених умов культивування у повітрі при атмосферному тиску та вміст розчиненого кисню у другому культуральному середовищі складає менше ніж 2,0 % відносно його кількості за насичених умов культивування у повітрі при атмосферному тиску.

9. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що друге культуральне середовище має величину рН, більшу ніж 1,5.

10. Спосіб за п. 9, який відрізняється тим, що друге культуральне середовище має величину рН, меншу ніж 3,0.

11. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що мікроорганізм, що проявляє Кребтрі-негативний фенотип, має знижену піруватдекарбоксилазну активність.

12. Спосіб за п. 11, який відрізняється тим, що мікроорганізм, що проявляє Кребтрі-негативний фенотип, вибирають з групи, що складається з *Kluuyveromyces thermotolerans*, *Kluuyveromyces lactic* та *Kluuyveromyces marxianus*.

13. Спосіб за п. 11, який відрізняється тим, що вміст розчиненого кисню у першому культураль-

(13) C2

(11) 77386

(19) UA

ному середовищі складає більше ніж 20 % відносно його кількості за насичених умов культивування у повітрі при атмосферному тиску та вміст розчиненого кисню у другому культуральному середо-

вищі складає менше ніж 2,0 % відносно його кількості за насичених умов культивування у повітрі при атмосферному тиску.

Винахід стосується способів і матеріалів, які застосовуються у виробництві органічних продуктів.

У промисловості широке застосування знаходять такі органічні продукти, як молочна кислота. Органічні кислоти можуть використовуватися, наприклад, у синтезі пластмас та інших продуктів. Для задоволення зростаючих з кожним днем потреб в органічних продуктах ведеться безперервний пошук все більш ефективних і економічних способів їх вироблення. В одному з таких способів для одержання органічних продуктів використовуються бактерії. Відомо, що певні бактерії за певних умов ферментації можуть виробляти великі кількості органічних продуктів. Проте використання живих бактерій у якості фабрик обмежується здатністю цих бактерій рости в умовах нагромадження органічного продукту в живильному середовищі. Для подолання цього обмеження застосовувалися найрізноманітніші способи очищення продукту в процесі його синтезу. Крім того, робилися спроби застосовувати інші мікроорганізми, що не є бактеріями. Дійсно, *Saccharomyces cerevisiae*, відома своєю кислотостійкістю, була піддана генетичній модифікації у спробі застосування її для вироблення молочної кислоти. Зокрема, клітини *S. cerevisiae* модифікувалися шляхом піддавання їх дії бичачої лактатдегідрогеназою ДНК і дезінтегрування ендегенних піруватдекарбоксилазних генів (PDC1, PDC5 і PDC6). Хоча модифіковані клітини *S. cerevisiae* і виробляли молочну кислоту, ріст цих клітин був пригнічений, вказуючи на те, що як ріст клітин, так і вироблення молочної кислоти потребує поліпшення.

В цілому даний винахід стосується способів і матеріалів для вироблення органічних продуктів. Зокрема, винаходом пропонуються дріжджові клітини, способи культивування дріжджових клітин, способи одержання дріжджових клітин, конструкцій нуклеїнових кислот, а також способи і матеріали для виготовлення різноманітних органічних продуктів. Винахід ґрунтується на тому виявленому авторами факті, що деякими мікроорганізмами (наприклад, бактеріальними або грибовими) можна керувати за допомогою генетичних засобів і надавати їм таким шляхом спроможності за певних умов культивування рости із найрізноманітніших вуглецевих джерел і давати найрізноманітнішу продукцію, у тому числі органічні продукти у промислових масштабах. Наприклад, запропоновані дріжджові клітини можуть рости і давати органічну продукцію при культивуванні їх в умовах низького рН і високої температури. Здатність до швидкого росту і високоєфективного вироблення органічної продукції в умовах, наприклад, низького рН і високої температури є особливо корисною. Зокрема, здатність мікроорганізму переносити низький рН

дозволяє уникнути необхідності підтримувати середовище з нейтральним рН, що може бути важким і дорогим при здійсненні промислових процесів. Крім того, способи і матеріали, що дозволяють одержувати потрібний органічний продукт із живильного середовища з низьким рН, можуть стати більш практичними й ефективними, ніж ті, що застосовуються для одержання того ж органічного продукту, але із живильного середовища, що має більш нейтральний рН. Наприклад, деякі органічні кислоти можуть преципітувати із розчину з рН, що падає нижче рівня pK_a продукту, значно спрощуючи тим самим виробничий процес. Що ж до спроможності мікроорганізму витримувати високі температури, то вона, ця спроможність, дозволяє уникнути необхідності підтримувати низькотемпературні умови на стадіях росту мікроорганізму і вироблення продукту. Зрозуміло, що зменшення потреби у підтриманні низьких температур у резервуарах із живильним середовищем великої ємності дозволяє весь процес зробити більш ефективним і менш дорогим. Крім того, здатність мікроорганізму переносити як низькі рН, так і високі температури дає у розпорядження зручний спосіб запобігання забрудненню робочого середовища іншими, менш стійкими мікроорганізмами в промислових процесах.

Слід зауважити, що суттєвою ознакою, що стосується здатності до промислового вироблення бажаного органічного продукту може бути питома продуктивність, за якої цей органічний продукт виробляється. Наприклад, забезпечення високої питомої продуктивності за допомогою описаних тут способів і матеріалів може дозволити мікроорганізму генерувати енергію, потрібну для культивування клітин у даних умовах культурного середовища - низького рН і високої температури. Генерування такої енергії може здійснюватися шляхом ферментації у практично анаеробних умовах, відмовляючись, таким чином, від генерування енергії респіраторним шляхом. Отримання потрібної енергії ферментаційним шляхом є особливо вигідним, коли процес вироблення органічного продукту не потребує респіраторного шляху, оскільки це дозволяє для одержання бажаного органічного продукту використовувати практично будь-яке відповідне джерело вуглецю, що є у розпорядженні.

Іншим підґрунтям для даного винаходу є те, що використання джерела вуглецю певними генетично регульованими мікроорганізмами може регулюватися і спрямовуватися переважним чином на вироблення чи то біомаси, чи то цільового органічного продукту. Взагалі кажучи, даним винаходом охоплюються два типи процесів культивування: в одному залучається культивування мікроорганізмів у специфічних умовах, де залежно

від застосовуваного мікроорганізму і бажаного виходу стимулюється продукування біомаси, а в іншому, за інших умов культивування, залежно також від застосовуваного мікроорганізму і бажаного виходу стимулюється продукування цільового органічного продукту. Ясно, що можливість керувати використанням джерела вуглецю у великомасштабному промисловому виробничому процесі робить останній більш гнучким і більш керованим, ніж до сих пір.

Крім того, винахід базується на тому спостереженні, що певними мікроорганізмами можна керувати генетичними засобами так, що майже все, якщо не цілком все, джерело вуглецю використовується для вироблення біомаси або бажаного органічного продукту. Зокрема винаходом пропонуються дріжджові клітини, модифіковані таким чином, щоб інактивувати шляхи біосинтезу, які відхиляють використання джерела вуглецю від вироблення біомаси або бажаного органічного продукту. Інактивація таких шляхів біосинтезу дає мікроорганізми, які можуть ефективно рости і виробляти бажаний продукт.

Взагалі предметом даного винаходу є дріжджові клітини, які містять екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид з ферментативною активністю в клітині. Ця нуклеїнова кислота може бути включеною в геном клітини. Ферментативна активність приводить до створення органічного продукту, який в деяких варіантах здійснення винаходу секретується з клітини. Ця клітина має негативний фенотип дикої яблуні і виробляє органічний продукт. Така клітина може походити, наприклад, з роду *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Trichosporon* або *Yamadazyma*. Органічним продуктом може бути, наприклад, продукт ферментації, продукт переробки пірувату, органічна кислота або карбоксилат, наприклад, лактат. В одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид може мати лактатдегідрогеназну активність. Наприклад, екзогенна нуклеїнова кислота може кодувати бактеріальну або грибову лактатдегідрогеназу, наприклад, грибову лактатдегідрогеназу *K. lactis*.

В іншому варіанті здійснення згадана клітина містить чотири екзогенні молекули нуклеїнової кислоти, які кодують різні поліпептиди. Наприклад, перша з цих чотирьох екзогенних молекул нуклеїнової кислоти може кодувати перший поліпептид, що має лактатдегідрогеназну активність, друга молекула може кодувати другий поліпептид, що має СоА-трансферазну активність, третя може кодувати третій поліпептид, що має лактил-СоА-дегідратазну активність, і нарешті четверта може кодувати четвертий поліпептид, що має акриліл-СоА-гідратазну активність. Карбоксилатним продуктом діяльності такої клітини може бути акрилат. В альтернативному варіанті перша з чотирьох екзогенних молекул нуклеїнової кислоти може кодувати перший поліпептид з 2-дегідро-3-деокси-Д-пентаноатальдолазною активністю, друга молекула може кодувати другий поліпептид з ксилонатдегідратазною активністю, третя молекула може кодувати третій поліпептид з ксилонлактоназною активністю і четверта молекула може кодувати четвертий поліпептид з Д-ксилозодегідрогеназною

активністю. Така клітина може виробляти вуглевод, наприклад, Д-ксилозу як органічний продукт.

Ще в одному варіанті здійснення винаходу клітина містить шість екзогенних молекул нуклеїнової кислоти, кожна з яких кодує свій поліпептид, що відрізняється від інших. Наприклад, перша з шести екзогенних молекул нуклеїнової кислоти може кодувати перший поліпептид, що має 2,5-діоксвалератдегідрогеназну активність, друга молекула може кодувати другий поліпептид, що має 5-дегідро-4-деокси-Д-глюкоаратдегідрогеназну активність, третя молекула може кодувати третій поліпептид, що має глюкоаратдегідратазну активність, четверта молекула може кодувати четвертий поліпептид, що має альдегіддегідрогеназну активність, п'ята молекула може кодувати п'ятий поліпептид, що має глюкуронолактонредуктазну активність, і нарешті шоста молекула може кодувати шостий поліпептид, що має L-гулонолактоноксидазну активність. Продуктом діяльності такої клітини може бути вітамін, наприклад, L-аскорбат як органічний продукт.

Органічний продукт може містити більше трьох атомів вуглецю і може бути, наприклад, амінокислотою.

В іншому варіанті здійснення винаходу клітина здатна на катаболічне перетворення пентозного джерела вуглецю, такого як рібоза, арабіноза, ксилоза і ліксоза.

Можливий також варіант, в якому клітина має знижену піруватдекарбоксилазну активність або знижену алкогольдегідрогеназну активність. Клітина може навіть зовсім не мати піруватдекарбоксилазної активності. Знижена піруватдекарбоксилазна активність може бути наслідком дезінтегрування генетичного локусу, який у нормальному стані має послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує піруватдекарбоксилазу. В альтернативному випадку клітина може містити молекулу «проти сенсу», наприклад, рібозиму, яка відповідає послідовності ендогенної нуклеїнової кислоти, де ця молекула знижує піруватдекарбоксилазну активність. Клітина може також містити додаткову молекулу екзогенної нуклеїнової кислоти, яка діє як плазмід-кілер.

В іншому варіанті здійснення ферментативна активність поліпептиду, кодованого екзогенною нуклеїновою кислотою, приводить до створення органічного продукту шляхом споживання NADH.

Можливий також варіант, в якому клітина виробляє принаймні 60г органічного продукту на кожні 100г споживаної глюкози за умов культивування, які є оптимальними для вироблення органічного продукту.

Згідно з іншою ознакою даного винаходу пропонується клітина, наприклад, дріжджова, яка містить екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, котра кодує поліпептид, що стимулює катаболічне перетворення пентозного джерела вуглецю цією клітиною. Таким поліпептидом може бути, наприклад, ксилозоредуктаза, ксилітолдегідрогеназа або ксилулокіназа, а пентозним джерелом вуглецю може бути, наприклад, рібоза, арабіноза, ксилоза і ліксоза. Клітина може також піддавати катаболічному перетворенню гексозу і, якщо потрібно, водночас катаболічно перетворювати гексозу і пенто-

зу. Гексозним джерелом вуглецю може бути, наприклад, алоза, альтроза, глюкоза, маноза, гулоза, йодоза, фруктоза, галактоза і талоза.

Згідно з ще однією ознакою даний винахід пропонує дріжджову клітину, що містить екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, що стимулює акумулювання ацетил-CoA в цитоплазмі клітини. Таким поліпептидом може бути поліпептид з цитратліазною активністю або мітохондріальний мембранний поліпептид, що стимулює проникність ацетил-CoA через мітохондріальну мембрану. Клітина може мати знижену піруватдекарбоксилазну активність або знижену алкогольдегідрогеназну активність. В альтернативному випадку дріжджова клітина може не виробляти етанол і мати швидкість росту в етанол- і ацетат-дефіцитних умовах культивування, яка є більшою ніж швидкість росту, що спостерігається у порівнянню етанол-дефіцитному продукуванню дріжджовими клітинами.

Згідно з ще однією ознакою даного винаходу пропонується дріжджова клітина зі зниженою активністю мітохондріального поліпептиду і негативним фенотипом дикої яблуні. Така клітина може бути, наприклад, із роду *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Trichosporon* або *Yamadazyma*. У цієї клітини активність цілком відсутня. Вона може містити дезінтегрований локус, який звичайно включає у себе нуклеїнокислотну послідовність, що кодує мітохондріальний поліпептид. Таким мітохондріальним поліпептидом може бути фермент циклу Кребса. Крім того, ця клітина може акумулювати продукт циклу Кребса. Клітина може включати у себе молекулу екзогенної нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з ферментативною активністю усередині клітини, причому ця ферментативна активність приводить до створення органічного продукту таким чином, що ця клітина виробляє цей органічний продукт. Органічним продуктом може бути, наприклад, цитрат, α -кетоглутарат, сукцинат, фумарат, малат і оксалоацетат. Зазначеним поліпептидом може бути поліпептид, що бере участь у катаболізмі лактату або ацетату.

Ще однією ознакою даного винаходу є спосіб вироблення органічного продукту. Цей спосіб включає у себе надання дріжджових клітин, які містять молекулу екзогенної нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з ферментативною активністю усередині клітин, причому ця ферментативна активність приводить до створення органічного продукту, а клітини мають негативний фенотип дикої яблуні, і культивування клітин у культурному середовищі так, що виробляється бажаний органічний продукт. Згадані дріжджові клітини можуть бути із роду *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Trichosporon* або *Yamadazyma*. Згаданим органічним продуктом може бути продукт ферментації, продукт переробки пірувату, органічний продукт, що містить більше трьох атомів вуглецю, карбоксилат, вуглевод, амінокислота, вітамін або ліпідний продукт. Органічним продуктом може бути також лактат, гліцерол, акрилат, ксиліоза, аскорбат, цитрат, ізоцитрат, α -кетоглутарат, сукциніл-CoA, сукцинат, фумарат, малат або оксалоацетат. У деяких варіантах здійснення винаходу органіч-

ний продукт секретується клітинами. Даний спосіб може давати клітини зі зниженою піруватдекарбоксилазною активністю або зниженою алкогольдегідрогеназною активністю. Ця ферментативна активність може приводити до створення органічного продукту шляхом споживання NADH.

Клітини, одержані у ці способи, можуть виробляти принаймні близько 60г органічного продукту на кожні 100г споживаної глюкози, коли стадія культивування є оптимальною для вироблення цього органічного продукту. Культурне середовище, яке може бути рідким, може включати у себе інгібітор клітинного дихання такий, як антимицин А, ціанід або азид. Стадія культивування може включати у себе вирощування клітин в аеробних умовах з наступним приведенням цих клітин у контакт з інгібітором клітинного дихання.

В альтернативному варіанті здійснення винаходу стадія культивування включає у себе інкубування клітин в анаеробних умовах культивування. Ще в одному варіанті здійснення стадія культивування включає у себе вирощування клітин в аеробних умовах росту з наступним інкубуванням цих клітин в анаеробних умовах культивування. Стадія культивування може також включати у себе культивування клітин при температурі більше ніж приблизно 35°C.

В одному з варіантів здійснення винаходу культурне середовище має величину органічного pH менше ніж приблизно 3,0 і/або величину неорганічного pH менше ніж приблизно 3,0. В іншому варіанті здійснення культурне середовище містить пентозне джерело вуглецю, наприклад, рібозу, арабінозу, ксиліозу або ліксозу. Культурне середовище може також включати у себе гідролізат маїсового волокна з величиною pH, наприклад, приблизно від 2,0 до 6,5.

Предметом даного винаходу є також спосіб вироблення органічного продукту, який включає у себе: а) надання дріжджових клітин, що містять екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, котрий стимулює катаболічне перетворення пентозного джерела вуглецю клітиною, причому згадана клітина має ферментативну активність, що приводить до створення згаданого органічного продукту; і b) культивування згаданих клітин у культурному середовищі так, що виробляється органічний продукт.

Згідно з ще одним предметом даного винаходу пропонується спосіб вироблення органічного продукту, який включає у себе: а) надання дріжджових клітин, що містять екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, котрий стимулює акумулювання ацетил-CoA в цитоплазмі клітини, причому згадана клітина має ферментативну активність, що приводить до створення згаданого органічного продукту; і b) культивування клітин у культурному середовищі так, що виробляється органічний продукт.

Предметом даного винаходу є також спосіб вироблення органічного продукту, який включає у себе: а) надання дріжджових клітин зі зниженою активністю мітохондріального ферменту, причому зниження активності приводить до акумулювання органічного продукту; і b) культивування згаданих клітин у культурному середовищі так, що виробля-

ється органічний продукт.

Згідно з ще одним предметом даного винаходу пропонується спосіб культивування дріжджових клітин негативного фенотипу дикої яблуні, який включає у себе культивування клітин у культурному середовищі, яке має величину органічного pH менше, ніж приблизно 3,0, і/або величину неорганічного pH менше, ніж приблизно 3,0. Стадія культивування може включати у себе культивування клітин при температурі більше, ніж приблизно 35°C. Культурне середовище може містити інгібітор клітинного дихання. Культурне середовище може також містити пентозне джерело вуглецю. В іншому варіанті здійснення винаходу культурне середовище може містити гідролізат маїсового волокна.

Згідно з ще однією особливістю даного винаходу пропонується спосіб культивування дріжджових клітин негативного фенотипу дикої яблуні, який включає у себе культивування клітин у культурному середовищі, яке містить гідролізат маїсового волокна.

Згідно з ще однією особливістю даного винаходу пропонується спосіб культивування дріжджових клітин негативного фенотипу дикої яблуні, який включає у себе культивування клітин у культурному середовищі при температурі більше, ніж приблизно 35°C, причому це культурне середовище має величину неорганічного pH менше, ніж приблизно 3,0.

Згідно з ще однією особливістю даного винаходу пропонується спосіб культивування дріжджових клітин негативного фенотипу дикої яблуні, який включає у себе культивування клітин у культурному середовищі при температурі більше, ніж приблизно 35°C, причому це культурне середовище містить пентозне джерело вуглецю.

Згідно з ще однією особливістю даного винаходу пропонується спосіб культивування дріжджових клітин негативного фенотипу дикої яблуні, який включає у себе культивування клітин у культурному середовищі при температурі більше, ніж приблизно 35°C, причому це культурне середовище містить гідролізат маїсового волокна.

Згідно з подальшою особливістю даного винаходу пропонується конструкція нуклеїнової кислоти, яка містить рекомбінантну послідовність і вибрану послідовність, причому рекомбінантна послідовність відповідає геномній послідовності клітини негативного фенотипу дикої яблуні, де геномна послідовність кодує експресований клітиною фермент, а вибрана послідовність кодує фермент, що приводить до створення органічного продукту усередині клітини. Вибрана послідовність може знаходитися усередині рекомбінантної послідовності так, що ця вибрана послідовність на кожному своєму кінці має рекомбінантну послідовність.

Ще однією особливістю даного винаходу є запропонований спосіб одержання рекомбінантної дріжджової клітини, який включає у себе: надання дріжджової клітини негативного фенотипу дикої яблуні; вибирання кінцевого продукту; визначення того, який екзогенний фермент чи ферменти потрібно добавляти в клітину для вироблення кінцевого продукту; визначення того, активність якого

ендогенного ферменту чи ферментів потрібно зменшити в даній клітині для того, щоб надати можливість вироблення в ній кінцевого продукту; добавлення визначеного екзогенного ферменту чи ферментів в надану дріжджову клітину і зниження активності визначеного ендогенного ферменту чи ферментів у наданій дріжджовій клітині так, щоб клітина виробляла кінцевий продукт за даних умов культивування.

Подальшим предметом даного винаходу є гідролізат маїсового волокна, який має величину pH у межах приблизно від 2,0 до 6,5. Цей гідролізат може містити глюкозу, ксилозу й арабінозу. Гідролізат може містити приблизно 40г/л глюкози, приблизно 40г/л ксилози і приблизно 20г/л арабінози. В альтернативному варіанті гідролізат може містити приблизно 38,7г/л глюкози, приблизно 39,1г/л ксилози, приблизно 20,7г/л арабінози і приблизно 1,6г/л фурфуралу.

Предметом даного винаходу є також спосіб одержання органічного продукту, який включає у себе: а) культивування мікроорганізму в даних умовах культури, де мікроорганізм має знижену ферментативну активність; ферментативною активністю при цьому може бути піруватдекарбоксилазна, алкогольдегідрогеназна, альдегіддегідрогеназна або ацетил-CoA-синтазна активність. Мікроорганізм при цьому виказує швидкість росту за відсутності етанолу й ацетату принаймні приблизно 30% від тієї, що спостерігається у відповідного мікроорганізму, що не має такої зниженої ферментативної активності; і б) зміну умов культивування для стимулювання вироблення органічного продукту.

Ще одним предметом даного винаходу є запропонований спосіб одержання органічного продукту, який включає у себе: а) культивування мікроорганізму в даних умовах культури, які стимулюють клітинне дихання, де мікроорганізм має знижену ферментативну активність; ферментативною активністю при цьому може бути піруватдекарбоксилазна, алкогольдегідрогеназна, альдегіддегідрогеназна або ацетил-CoA-синтазна активність, причому мікроорганізм виказує швидкість росту за відсутності етанолу й ацетату принаймні приблизно 30% від тієї, що спостерігається у відповідного мікроорганізму, що не має такої зниженої ферментативної активності; і б) зміну умов культивування для зниження клітинного дихання, стимулюючи тим самим вироблення органічного продукту.

Якщо не зазначено іншого, то всі застосовані тут науково-технічні терміни мають звичайні значення, загальноприйняті у даній галузі і відомі фахівцям, яких стосується даний винахід. Хоча в практичному здійсненні або у випробуваннях даного винаходу можуть застосовуватися подібні або еквівалентні описаним тут способи і матеріали, відповідні способи і матеріали описані нижче. Всі публікації, патентні заявки, патенти та інші згадані тут літературні джерела включені у даний опис шляхом посилань в усій їхній повноті. У разі конфліктної ситуації даний опис призначений служити в якості базового документу для урегулювання справи. Крім того, описані тут матеріали, способи і приклади мають* виключно ілюстративне, а не

обмежувальне призначення.

Інші ознаки і переваги даного винаходу будуть докладно з'ясовані у подальшому опису й окреслені у Формулі винаходу.

Фіг.1. Схема, що ілюструє плазмиду pHES.

Фіг.2. Схема, що ілюструє плазмиду pSEH.

Фіг.3. Схема, що ілюструє генерацію плазмід pCRII, які містять Lh-1dh або Pa-1dh.

Фіг.4. Схема, що ілюструє плазмиди 1dh/pCRII.

Фіг.5. Схема, що ілюструє генерацію плазмід pHES, які містять Lh-1dh або Pa-1dh.

Фіг.6A. Схема, що ілюструє генерацію нокаут-фрагмента піруватдекарбоксилази (PDC).

Фіг.6B. Схема, що ілюструє 5,5 kbp фрагмент, який оточує 1,7 kbp PDC1 *K. marxianus*.

Фіг.6C. Схема, що ілюструє делецію 400 pb гомологічної ділянки 5,5 kbp PDC і інсерцію гена стійкості до канаміцину.

Фіг.6D. Схема, що ілюструє 4 kb ділянку, яка містить ген стійкості до канаміцину і оточує 2,3 kbp PDC1.

Фіг.6E. Схема, що ілюструє 7,5 kbp PDC1 *K. Thermotolerans* і навколишню ділянку.

Фіг.6F. Схема, що ілюструє делецію 750 bp із 1,7 kbp гена PDC1 і інсерцію гена стійкості до канаміцину.

Фіг.7. Графік росту (оптична густина, OD) в часі (години) *Kluyveromyces marxianus*, вирощуваних в умовах низького pH (pH 2,5) і високої температури (40°C).

Фіг.8. Графік росту (оптична густина, OD) в часі (години) *K. marxianus*, вирощуваних з глюкозою, ксилозою або арабінозою при температурі 30°C.

Фіг.9. Графік росту (оптична густина, OD) в часі (години) *K. marxianus*, вирощуваних з гідроліза-том маїсового волокна при температурі 30°C.

Фіг.10. Графік росту (оптична густина, OD) в часі (години) *K. marxianus*, вирощуваних при температурі 30°C і зазначеному pH.

Фіг.11. Графік росту (оптична густина, OD) в часі (години) *K. marxianus*, вирощуваних при температурі 30°C і зазначеному pH за наявності 40 г молочної кислоти.

Фіг.12. Три графіки залежності вироблення біомаси (A), споживання глюкози (B) і вироблення етанолу (C) мікроорганізмами *S. uvarum* і *K. marxianus*, культивованими на мінеральному середовищі з 2% глюкози в аеробних умовах.

Фіг.13. Три графіки залежності вироблення біомаси (A), споживання глюкози (B) і вироблення етанолу (C) мікроорганізмами *S. uvarum* і *K. marxianus*, культивованими на мінеральному середовищі з 2% глюкози в анаеробних умовах.

Фіг.14. Плазмідна карта промоторного вектора PDC1.

Даним винаходом пропонуються способи і матеріали, що стосуються вироблення органічних продуктів. Зокрема, винаходом пропонуються дріжджові клітини, способи культивування дріжджових клітин, способи одержання дріжджових клітин, конструкції нуклеїнових кислот, способи і матеріали для вироблення різноманітних органічних продуктів.

Запропоновані дріжджові клітини можуть використовуватися для вироблення органічних продуктів. Такі органічні продукти можуть використовуватися

в широких межах практичного застосування. Наприклад, органічні продукти, вироблені описаними тут дріжджовими клітинами, можуть використовуватися в якості консервантів або добавок в їжу, фармацевтичних і косметичних продуктів, а також для виготовлення пластмас та інших продуктів.

Для цілей даного винаходу органічним продуктом є будь-яка сполука, що містить атом вуглецю. Наприклад, органічними продуктами є карбоксилати (наприклад, лактат, акрилат, цитрат, ізоцитрат, α -кетоглутарат, сукцинат, фумарат, малат, оксалоацетат), вуглеводи (наприклад, D-ксилоза), альдітоли (наприклад, ксилітол, арабітол, рібітол), амінокислоти (наприклад, гліцин, триптофан, глютамат), ліпіди, ефіри, вітаміни (наприклад, L-аскорбат), поліолі (наприклад, гліцерол, 1,3-пропанедіол, еритритол), альдегіди, алкени, алкіни і кетони. Таким чином, органічний продукт може містити один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять і більше атомів вуглецю. Крім того, органічні продукти можуть мати молекулярну масу менше, ніж приблизно 1000 (наприклад, менше ніж приблизно 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 або 100). Наприклад, D-ксилоза ($C_5H_{10}O_5$) є органічним продуктом, молекулярна маса якого складає 150. Органічні продукти можуть бути також продуктами ферментації. Використовуваний тут термін «продукт ферментації» стосується будь-якої органічної сполуки, одержаної шляхом ферментації. У загальному випадку спосіб ферментації передбачає анаеробне ферментаційне перетворення органічних сполук таких, наприклад, як вуглеводи, на такі сполуки, як етиловий спирт, з накопиченням звільненої енергії у формі аденозинтрифосфату (АТФ). Таким чином, ферментація відрізняється від клітинного дихання тим, що в якості акцепторів електронів тут використовуються органічні продукти, а не молекулярний кисень. У якості прикладів продуктів ферментації можна назвати, не обмежуючись лише ними, ацетат, етанол, бутират і лактат.

Органічними продуктами можуть бути також продукти переробки пірувату. Використовуваний тут термін «продукт переробки пірувату» стосується будь-якої сполуки, синтезованої з пірувату не більш ніж за 15 ферментативних стадій. Ферментативною стадією є будь-яка хімічна реакція або серія реакцій, каталізованих поліпептидом, що має ферментативну активність. Використовуваний тут термін «поліпептид, що має ферментативну активність» стосується будь-якого поліпептиду, що каталізує хімічні реакції між іншими речовинами, залишаючись по завершенні реакції або реакцій незруйнованим і незмінним. Ферментативний поліпептид, як правило, каталізує створення одного і більше продуктів із одної і більше речовин. Такі поліпептиди можуть мати будь-який тип ферментативної активності, включаючи, але не обмежуючись лише цим, ферментативну активність, зв'язану з такими ферментами, як аконітаза, ізоцитратдегідрогеназа, кетоглутаратдегідрогеназа, сукцинаттїокіназа, сукцинатдегідрогеназа, фумараза, малатдегідрогеназа, цитратсинтаза, 2,5-діоксвалератдегідрогеназа, 5-дегідро-4-деокси-D-глюкаратдегідрогеназа, глюкаратдегідратаза, аль-

дегіддегідрогеназа, глюкуронолактонредуктаза, L-гулонолактонооксидаза, 2-дегідро-3-деокси-D-пентаноатальдолаза, ксилонатдегідратаза, ксилонлактоназа, D-ксилозодегідрогеназа, лактатдегідрогеназа, CoA-трансфераза, лактил-CoA-дегідратаза або акриліл-CoA-гідратаза.

Слід зауважити, що поліпептид з даною ферментативною активністю може бути як природного, так і неприродного походження. Поліпептидом природного походження є будь-який поліпептид, що має амінокислотну послідовність, котра зустрічається в природі, включаючи поліпептиди дикого типу і поліморфні поліпептиди. Поліпептиди природного походження можуть одержуватися від будь-яких видів і, у тому числі, ссавців, грибових і бактеріальних видів. Поліпептидом неприродного походження може бути будь-який поліпептид, амінокислотна послідовність якого в природі не зустрічається. Отже поліпептидом неприродного походження може бути мutowана версія поліпептиду природного походження або поліпептид, одержаний за методами генної інженерії. Наприклад, поліпептидом неприродного походження з цитратсинтазною активністю може бути мutowана версія природного поліпептиду з цитратсинтазною активністю, в котрій залишилась принаймні деяка цитратсинтазна активність. Поліпептид може бути мutowаний, наприклад, додаваннями, делеціями і/або заміщеннями послідовностей.

Органічний продукт не є продуктом переробки пірувату, якщо він синтезований із пірувату за більш ніж 15 ферментативних стадій. В число продуктів переробки пірувату входять, не обмежуючись лише ними, цитрат, α-кетоглутарат, сукцинат, фумарат, малат, оксалоацетат, 2-дегідро-3-деокси-D-ксилоноат, D-ксилоноат, D-ксилонолактон, D-ксилоза, акрилат, ацетат, етанол, бутират і лактат.

Для цілей даного винаходу карбоксилатні продукти, які можуть бути у «вільнокислотній» або «сольовій» формі, одержують тут назви відповідно до номенклатури сольових форм. Наприклад, молочна кислота тут зветься лактатом. Таким чином, у даному випадку терміном «лактат» охоплюються як молочна кислота, так і лактат.

Використовуваний тут термін «нуклеїнова кислота» охоплює як РНК, так і ДНК, включаючи кДНК, геномну ДНК, синтетичну (наприклад, хімічно синтезовану) ДНК. Нуклеїнова кислота може бути дволанцюговою або одностанцюговою. Одностанцюгова нуклеїнова кислота може являти собою ланцюг, що має сенс, або ланцюгом «проти сенсу». Крім того, нуклеїнова кислота може бути кільцевою або лінійною.

Використовуваним тут терміном «екзогенний» стосовно молекули нуклеїнової кислоти і конкретної клітини визначається будь-яка молекула нуклеїнової кислоти, що не походить із даної клітини за природних умов. Отже всі молекули нуклеїнових кислот неприродного походження вважаються екзогенними до клітин, в які вони введені. Слід зауважити, що молекули нуклеїнових кислот неприродного походження можуть містити нуклеїнокислотні послідовності або фрагменти нуклеїнокислотних послідовностей, які зустрічаються в природі за умов, що даної молекули нук-

леїнової кислоти в цілому в природі не існує. Наприклад, молекула нуклеїнової кислоти, що містить послідовність геномної ДНК у векторі експресії, вважається молекулою нуклеїнової кислоти неприродного походження і отже є екзогенною до клітини, в яку вона уведена, оскільки цієї молекули нуклеїнової кислоти в цілому (геномна ДНК + вектор ДНК) в природі не існує. Таким чином, будь-який вектор, що автономно реплікує плазмиду або вірус (наприклад, ретровірус, аденовірус, або вірус герпеса), якого в цілому в природі не існує, вважається молекулою нуклеїнової кислоти неприродного походження. Звідси випливає, що фрагменти геномної ДНК, продуковані полімеразною ланцюговою реакцією (PCR) або оброблянням ендонуклеазою рестрикції, а також кДНК, розглядаються як молекули нуклеїнової кислоти неприродного походження, оскільки вони існують у формі відокремлених молекул, які в природі не зустрічаються. Звідси також випливає, що будь-яка молекула нуклеїнової кислоти, яка містить промоторну послідовність і послідовність, що кодує поліпептид, (наприклад, кДНК або геномну ДНК) в структурі, яка в природі не зустрічається, розглядається як молекула нуклеїнової кислоти неприродного походження.

Термін «ендогенний» стосується геномного матеріалу, який не є екзогенним. У загальному випадку ендогенний геномний матеріал створюється в організмі, тканині або клітині і не уводиться, а також не модифікується за рекомбінантними методами. Ендогенний геномний матеріал не включає у сферу свого визначення варіації природного походження.

Слід також зауважити, що молекула нуклеїнової кислоти природного походження може бути для даної клітини екзогенною. Наприклад, ціла хромосома, виділена із клітини людини X, вважається екзогенною молекулою нуклеїнової кислоти по відношенню до клітини людини Y, якщо ця хромосома уведена в клітину людини Y.

Використовуваний тут термін «генетично модифікований» стосується організму, геном якого був модифікований, наприклад, додаванням, заміщенням або делецією генетичного матеріалу. Способи додавання або делеції генетичного матеріалу добре відомі і включають до свого числа, але не обмежуючись лише ними, неспецифічний мутагенез, точкові мутації, включаючи інсерції, делеції і заміщення, нокаут-методи і трансформування організму нуклеїнокислотою послідовністю за допомогою рекомбінантних методів, включаючи як стабільні, так і перехідні трансформанти. Дріжджові клітини можуть також піддавати катаболічним перетворенням крохмаль, як природним шляхом, так і через генетичну модифікацію, і можуть навіть бути генетично модифіковані для катаболічного перетворення целюлози шляхом додавання, наприклад, целюлази на грибовій основі.

1. Дріжджові клітини негативного фенотипу дикої яблуні

Винаходом пропонуються різноманітні генетично регульовані дріжджові клітини негативного фенотипу дикої яблуні. Такі рекомбінантні дріжджові клітини можуть застосовуватися у виробленні органічних продуктів. Наприклад, винаходом

пропонується дріжджова клітина негативного фенотипу дикої яблуні, яка містить екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид з ферментативною активністю, котра приводить до створення органічного продукту. Такі дріжджові клітини входять в об'єм даного винаходу з умови, що вони виробляють органічний продукт. Слід зауважити, що вироблений органічний продукт може секретуватися дріжджовою клітиною, уникаючи необхідності розривання клітинної мембрани для його видобування. Типові дріжджові клітини за даним винаходом виробляють органічний продукт з виходом принаймні приблизно 40г (наприклад, принаймні 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90 або 95г) органічного продукту на кожні 100г споживаної глюкози при культивуванні в оптимальних для вироблення продукту умовах. Для оцінки виходу процесу вироблення органічного продукту даною дріжджовою клітиною може бути застосований будь-який спосіб, див., наприклад, [Kiers et al., *Yeast*, 14(5):459-469 (1998)]. Слід також зауважити, що ферментативна активність кодованого поліпептиду може приводити до створення органічного продукту шляхом споживання NADH. Іншими словами, вироблення даної органічної сполуки може потребувати NADH у якості джерела енергії. Термін «NAD» стосується кофакторів, що діють як носії електрону й водню в даних окисно-відновних реакціях, у той час як термін «NADH» стосується відновленої форми NAD. У якості прикладів органічних продуктів, синтез яких потребує NADH, можна назвати, але не обмежуючись лише ними, лактат, етанол, ацетат і акрилат. Як правило, дріжджові клітини згідно з даним винаходом піддають катаболічному перетворенню пентозне джерело вуглецю, таке як пентоза. Однак, такі дріжджові клітини можуть також піддавати каталітичному перетворенню пентозне джерело вуглецю (наприклад, рібозу, арабінозу, ксилозу й ліксозу). Іншими словами, дріжджова клітина за даним винаходом може використовувати пентозне джерело вуглецю як природним шляхом, так і бути пристосованою штучно для використання пентозного джерела вуглецю. Наприклад, дріжджова клітина може бути наділена екзогенною молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує ксилозоредуктазу, ксилитолдегідрогеназу і/або ксилулокіназу так, що ксилітоза може піддаватися катаболічному перетворенню. Дріжджові клітини можуть також катаболічно перетворювати крохмаль як природним шляхом, так і через генетичну модифікацію, і можуть бути навіть генетично модифіковані для катаболічного перетворення целюлози шляхом добавлення, наприклад, целюлози на грибовій основі.

Дріжджовою клітиною негативного фенотипу дикої яблуні є будь-яка дріжджова клітина, що не виказує ефекту дикої яблуні. Термін «негативний фенотип дикої яблуні» стосується організмів як природного походження, так і генетично модифікованих. Коротко, ефект дикої яблуні полягає в інгібуванні споживання кисню мікроорганізмом при культивуванні його в аеробних умовах через наявність високої концентрації глюкози (наприклад, 50г глюкози/літр). Іншими словами, дріжджова клітина позитивного фенотипу дикої яблуні продовжує давати бродіння незалежно від доступності кисню

завдяки наявності глюкози, у той час як дріжджова клітина негативного фенотипу дикої яблуні не виказує глюкозо-опосередкованого інгібування споживання кисню. У якості прикладів дріжджових клітин, які звичайно відносяться до негативного фенотипу дикої яблуні, можна назвати, але не обмежуючись лише ними, дріжджові клітини таких родів: *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Trichosporon* і *Yamadazyma*.

Як згадувалося вище, винаходом пропонується багато різних типів рекомбінантних дріжджових клітин, здатних виробляти велике різноманіття органічних продуктів. Наприклад, дріжджова клітина може містити екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, з лактатдегідрогеназою активністю так, що виробляється лактат. У якості прикладів таких поліпептидів можна назвати, але не обмежуючись лише ними, біачу лактатдегідрогеназу, бактеріальну лактатдегідрогеназу і грибову лактатдегідрогеназу, наприклад, грибову лактатдегідрогеназу *K. lactis* або *K. thermotolerans*. Тут також поліпептиди, що володіють ферментативною, наприклад, лактатдегідрогеназою активністю, можуть бути як природного, так і неприродного походження.

Слід зауважити, що описані тут дріжджові клітини можуть містити одну копію або багато копій (наприклад, приблизно 5, 10, 20, 35, 50, 75, 100 або 150 копій) даної екзогенної молекули нуклеїнової кислоти. Наприклад, дріжджова клітина може містити 50 копій екзогенної молекули X нуклеїнової кислоти. Слід зауважити також, що описані тут дріжджові клітини можуть містити більш ніж одну екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти. Наприклад, дріжджова клітина може містити приблизно 50 копій екзогенної молекули X нуклеїнової кислоти, а також приблизно 75 копій екзогенної молекули Y нуклеїнової кислоти. У даному випадку молекули нуклеїнових кислот двох різних типів можуть кодувати різні поліпептиди зі своєю власною ферментативною активністю. Наприклад, дріжджова клітина може містити чотири різні екзогенні молекули нуклеїнової кислоти так, щоб вироблявся акрилат. У даному прикладі така дріжджова клітина може містити першу екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з лактатдегідрогеназою активністю, другу молекулу, що кодує поліпептид з CoA-трансферазою активністю, третю молекулу, що кодує поліпептид з лактил-CoA-дегідратазою активністю, і нарешті четверту молекулу, що кодує поліпептид з акрил-CoA-гідратазою активністю. В іншому варіанті дріжджова клітина може містити чотири різні екзогенні молекули нуклеїнової кислоти так, щоб вироблялася D-ксилітоза. Зокрема, така дріжджова клітина може містити першу екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з 2-дегідро-3-деокси-D-пентаноатальдолазою активністю, другу молекулу, що кодує поліпептид з ксилонатдегідратазою активністю, третю молекулу, що кодує поліпептид з ксилонлактоназою активністю і четверту молекулу, що кодує поліпептид з D-ксилітодегідрогеназою активністю. Можливий також варіант, в якому дріжджова клітина містить шість різних екзогенних молекул нуклеїнової кислоти так, щоб вироблявся вітамін L-аскорбат. Зок-

рема, така дріжджова клітина може містити першу екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з 2,5-діоксвалератдегідрогеназною активністю, другу молекулу, що кодує поліпептид з 5-дегідро-4-деокси-D-глюкатдегідрогеназною активністю, третю молекулу, що кодує поліпептид з глюкатдегідратазною активністю, четверту молекулу, що кодує поліпептид з альдегідегідрогеназною активністю, п'яту молекулу, що кодує поліпептид з глюкуронолактонредуктазною активністю, і шосту молекулу, що кодує поліпептид з L-гулонолактоноксидазною активністю.

Слід зауважити, що ферментативні поліпептиди можуть використовуватися таким чином, щоб цільовий органічний продукт був оптично чистим (наприклад, приблизно 90, 95, 99% чистоти). Наприклад, поліпептид з (L)-лактатдегідрогеназною активністю може застосовуватися для вироблення (L)-лактату.

Дріжджові клітини за даним винаходом можуть також мати знижену ферментативну, наприклад, піруватдекарбоксилазну і/або алкогольдегідрогеназну активність. Термін «знижений», застосований тут по відношенню до клітини і даної ферментативної активності, означає більш низький рівень ферментативної активності, ніж рівень, вимірний у порівняно дріжджової клітини того ж виду. Таким чином, дріжджова клітина з дефіцитом піруватдекарбоксилазної активності розглядається як така, що має знижену піруватдекарбоксилазну активність, оскільки більшість порівняних дріжджових клітин, якщо не всі вони, мають принаймні деяку піруватдекарбоксилазну активність. Такі знижені рівні ферментативної активності можуть бути результатом знижених концентрацій ферменту, зниженої питомої активності ферменту або того й іншого разом. Для одержання дріжджових клітин зі зниженою ферментативною активністю можуть застосовуватися найрізноманітніші способи. Наприклад, за допомогою генної інженерії дріжджова клітина може бути наділена дезінтегрованим ферменто-кодуючим локусом із застосуванням загального мутагенезу або нокаут-методу, див., наприклад, [Methods in Yeast Genetics (1997 edition), Adams, Gottschling, Kaiser, and Sterns, Cold Spring Harbor Press (1998)]. Для зниження ферментативної активності може застосовуватися також спосіб «проти сенсу». Наприклад, дріжджова клітина за методами генної інженерії може бути перетворена так, щоб містити кДНК, що кодує молекулу «проти сенсу», яка запобігає утворенню ферменту. Термін «молекула проти сенсу» охоплює собою всі можливі молекули нуклеїнових кислот, які містять послідовності, що відповідають кодувальному ланцюгу ендогенного поліпептиду. Молекула «проти сенсу» може також мати флангові (наприклад, регуляторні) послідовності. Отже молекулами «проти сенсу» можуть бути рибозими або олігонуклеотиди «проти сенсу». Рибозима може мати будь-яку загальну структуру, у тому числі, шпилькоподібну, молотоподібну або сокироподібну структуру за умови, що ця молекула розщеплює РНК.

Ідентифікація дріжджових клітин зі зниженою ферментативною активністю може здійснюватися у будь-який спосіб. Наприклад, дріжджова клітина зі зниженою піруватдекарбоксилазною активністю

може бути легко ідентифікована за допомогою загальновідомих способів, описаних, наприклад, в [Ulbrich, Methods in Enzymology 18:109-115(1970)].

2. Дріжджові клітини позитивного і негативного фенотипів дикої яблуні

Винаходом також пропонуються різноманітні генетично регульовані дріжджові клітини, які не потребують наявності у них негативного фенотипу дикої яблуні. Іншими словами такі клітини можуть бути як позитивного, так і негативного фенотипів дикої яблуні. Такі рекомбінантні дріжджові клітини можуть застосовуватися у виробленні органічних продуктів. Наприклад, винаходом пропонується дріжджова клітина, що містить екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, котра кодує поліпептид, що стимулює катаболічне перетворення цієї клітиною пентозного джерела вуглецю (наприклад, рібози, арабінози, ксилози, ліксози). Зокрема, дріжджова клітина може мати екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, котра кодує ксилоредуктазу, ксилітол-дегідрогеназу і/або ксилулокіназу так, що ксилоза може катаболічно перетворюватися більш ефективним шляхом. Крім того, дріжджові клітини, здатні катаболічно перетворювати пентозне джерело вуглецю, можуть також бути здатними катаболічно перетворювати гексозне джерело вуглецю (наприклад, алозу, альтрозу, глюкозу, манозу, гулозу, йодозу, галактозу й талозу) як послідовно, так і одночасно. Наприклад, дріжджова клітина може бути модифікована шляхом генної інженерії так, що катаболічне перетворення ксилози і глюкози буде відбуватися одночасно. Слід зауважити, що дріжджові клітини з підвищеною здатністю катаболічно перетворювати пентозу можуть застосовуватися для модифікації дріжджових клітин, здатних виробляти органічні продукти із пентозних джерел вуглецю. Ця властивість є особливо корисною, оскільки такі пентозні джерела вуглецю, як ксилоза, у загальному випадку є менш дорогими, ніж такі гексозні джерела вуглецю, як глюкоза. Серед інших вуглецевих джерел, які можуть піддаватися катаболічному перетворенню, можна назвати, не обмежуючись лише ними, мелібіозу, сахарозу, фруктозу, рафінозу, стахіозу, крохмаль (наприклад, маїсовий крохмаль і пшеничний крохмаль) і гідролізат (наприклад, гідролізат маїсового волокна та інші целюлозні гідролізати).

Крім того, винаходом пропонується дріжджова клітина, яка містить екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, котрий стимулює акумулювання ацетил-CoA в цитоплазмі клітини. Наприклад, дріжджова клітина може мати екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з цитратліазною активністю. В альтернативному варіанті дріжджова клітина може мати екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує мітохондріальний мембранний поліпептид, котрий стимулює ацетил-CoA-проникність крізь мітохондріальну мембрану. Слід зауважити, що багато дріжджових клітин, котрим бракує здатності виробляти етанол, не можуть рости за відсутності етанолу й ацетату. Як правило, дріжджова клітина не має здатності виробляти етанол, коли їй тим чи іншим чином бракує піруватдекарбоксилазної або алкогольдегідрогеназної активності. Наприклад, дріжджі позитивного фенотипу дикої яблуні (напри-

клад, *Saccharomyces*), у яких відсутня піруватдекарбоксилазна активність, слабо ростуть за відсутності етанолу й ацетату. Таким чином, керування такими дріжджами позитивного фенотипу дикої яблуні у напрямку зменшення продукування етанолу з метою переспрямування використання пірувату на інші органічні продукти (наприклад, лактат і акрилат) приводить до погіршення характеристик росту за відсутності етанолу й ацетату, і особливо тому що дріжджі позитивного фенотипу дикої яблуні обмежують клітинне дихання за наявності глюкози. Згідно з даним описом дріжджові клітини, здатні стимулювати акумулювання цитоплазматичного ацетил-СоА, який певним чином відрізняється від того, що базується на концентрації цитоплазматичного ацетату і ацетил-СоА-синтазної активності, можуть рости за відсутності етанолу й ацетату навіть, коли вони не є спроможними виробляти етанол. Слід зауважити, що дріжджові клітини, здатні рости за відсутності етанолу й ацетату, не маючи при цьому спроможності виробляти етанол, можуть переспрямовувати використання пірувату на вироблення інших, ніж етанол, органічних продуктів.

Дріжджі будь-якого типу можуть містити екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, що стимулює акумулювання ацетил-СоА в цитоплазмі клітини. Наприклад, дріжджова клітина негативного або позитивного фенотипу дикої яблуні може містити екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, що стимулює акумулювання ацетил-СоА в цитоплазмі клітини. Як правило, такі дріжджові клітини можуть бути ідентифіковані (1) шляхом керування клітиною, що містить екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, таким чином, щоб вона не мала піруватдекарбоксилазної або алкогольдегідрогеназної активності, (2) шляхом визначення характеристик росту клітини, культивованої за наявності титраційних кількостей інгібітора дихання (наприклад, антимицину А, ціаніду або азиду), і (3) порівняння цих характеристик росту з тими, що спостерігаються у порівняно дріжджової клітини, яка не містить екзогенної молекули нуклеїнової кислоти і яка також була регульована на відсутність піруватдекарбоксилазної або алкогольдегідрогеназної активності. Дріжджові клітини, визначені в результаті такого порівняння як такі, що мають більш сприятливі характеристики росту завдяки наявності екзогенної молекули нуклеїнової кислоти, вважаються такими, що містять екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, що стимулює акумулювання ацетил-СоА в цитоплазмі клітини.

Дріжджові клітини, що містять екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, що стимулює акумулювання ацетил-СоА в цитоплазмі клітини, також можуть мати знижену ферментативну активність, наприклад, знижену піруватдекарбоксилазну і/або алкогольдегідрогеназну активність. Наприклад, дріжджова клітина може не мати здатності виробляти етанол. Звичайно, такі дріжджові клітини мають швидкість росту за умов культивування без етанолу й ацетату, яка є вищою (наприклад, приблизно 5, 10, 20, 35, 50, 75, 100, 150, 200% або більше), ніж швидкість росту, що спостерігається у порівняних дріжджових клітин

(тобто дріжджових клітин, що не мають здатності виробляти етанол), які не містять екзогенної нуклеїнової кислоти і, до того ж, культивувалися за подібних умов (тобто без етанолу й ацетату).

Винаходом також пропонується дріжджова клітина зі зниженою активністю поліпептиду. Такі дріжджові клітини можуть мати позитивний або негативний фенотип дикої яблуні. Наприклад, дріжджова клітина за даним винаходом може мати знижену активність поліпептиду плазматичної мембрани (наприклад, переносника плазматичної мембрани), цитоплазматичного поліпептиду (наприклад, піруватдекарбоксилази) і/або мітохондріального поліпептиду (наприклад, піруватдегідрогенази). Термін «переносник плазматичної мембрани» стосується поліпептидів, які полегшують рух органічних продуктів крізь плазматичну мембрану. В якості прикладів таких поліпептидів можна назвати, без обмеження, переносники карбонової кислоти, такі як JEN1 в *S. cerevisiae* (номер доступу U24155 в генбанку (Genbank)). Термін «мітохондріальний поліпептид» стосується будь-якого поліпептиду, що функціонує в мітохондріях, включаючи без обмеження піруватдегідрогеназу, поліпептиди, що беруть участь в катаболізмі лактату або ацетил-СоА (наприклад, поліпептид цитохрому b2) і ферменти циклу Кребса. До числа ферментів циклу Кребса належать аконітаза, ізоцитратдегідрогеназа, кетоглутаратдегідрогеназа, сукцинаттіокіназа, сукцинатдегідрогеназа, фумараза, малатдегідрогеназа і цитратсинтаза. Згідно з даним описом дріжджова клітина зі зниженою ферментативною активністю може повністю бути позбавлена даної ферментативної активності. Слід зауважити, що термін «знижена», використовуваний по відношенню до активності дріжджової клітини і поліпептиду, стосується більш низького рівня активності, ніж той, що спостерігається у порівняно дріжджової клітини того ж виду за подібних умов. Таким чином, дріжджова клітина, позбавлена даної транспортної активності, вважається такою, що має знижену транспортну активність порівняно з клітиною, яка має принаймні деяку транспортну активність. Такі знижені поліпептидні активності можуть бути результатом зниженої концентрації поліпептидів, зниженої питомої активності поліпептиду або того й іншого разом. Для одержання дріжджової клітини зі зниженою поліпептидною активністю можуть застосовуватися будь-які способи. Наприклад, локус, який має нуклеїно кислотну послідовність, що кодує мітохондріальний поліпептид, може бути інактивований, наприклад, шляхом загального мутагенезу або за допомогою нокаут-методу.

Слід зауважити, що дріжджові клітини зі зниженою активністю мітохондріального ферменту можуть акумулювати продукти циклу Кребса (наприклад, цитрат, ізоцитрат, α -кетоглутарат, сукциніл-СоА, сукцинат, фумарат, малат і оксалоацетат). Наприклад, дріжджові клітини зі зниженою фумаразною активністю можуть акумулювати фумарат. Крім того, дріжджова клітина може містити екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з ферментативною активністю, яка приводить до створення органічного продукту так, що клітина виробляє органічний продукт.

Слід зауважити, що деякі продукти циклу Кре-

бса не можуть проникати крізь мітохондріальну мембрану (наприклад, α -кетоглутарат і сукциніл-СоА). Отже зниження активності конкретних ферментів циклу Кребса буде приводити до акумулювання певних продуктів циклу Кребса в порожнині мітохондрій. У цих випадках дріжджові клітини зі зниженою активністю ферменту циклу Кребса можуть бути за методами генної інженерії модифіковані так, щоб містити одну і більше екзогенних молекул нуклеїнової кислоти, кожна з яких буде кодувати поліпептид зі своєю особливою ферментативною активністю, а цільовий продукт циклу Кребса буде акумулюватися в цитоплазмі. Наприклад, зниження кетоглутаратдегідрогеназної активності буде мати результатом акумулювання α -кетоглутарату, що у свою чергу приведе до акумулювання ізоцитрату. Альфа-кетоглутарат не може проникати крізь мітохондріальну мембрану, у той час як ізоцитрат крізь неї проникати може. Таким чином, ізоцитрат може акумулюватися в цитоплазмі клітини. Проте дріжджові клітини, які також містять екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з ізоцитратдегідрогеназною активністю, і експресують цей функціональний поліпептид в цитоплазмі, можуть виробляти цитоплазматичний α -кетоглутарат. Таким чином, зниження активності конкретних ферментів циклу Кребса з наданням екзогенних молекул нуклеїнової кислоти, що кодують ті ж самі (або різні) ферменти циклу Кребса так, що вони можуть функціонувати в цитоплазмі, може мати результатом вироблення різноманітних продуктів циклу Кребса (або продуктів, одержуваних переробкою продуктів циклу Кребса) в цитоплазмі.

Далі, винаходом пропонується дріжджова клітина зі зниженою активністю ферменту, який виводить використання вуглецевого джерела з процесу вироблення біомаси або бажаного органічного продукту. Наприклад, ферменти гліцерольного або ацетоїнового шляхів можуть бути дезінтегровані так, що вуглецеве джерело в культурному середовищі буде використовуватися переважно для вироблення біомаси або бажаного органічного продукту. У якості прикладу ферменту гліцерольного шляху можна назвати без обмеження дигідроксіацетонфосфатредуктазу. У числі ферментів ацетоїнового шляху входять, не обмежуючись лише ними, α -ацетолактатсинтаза і α -ацетолактатдекарбоксилаза. Тут також для зниження активності ферменту може бути застосований будь-який спосіб.

Крім того, будь-які запропоновані тут дріжджові клітини можуть містити екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що діє як плазмід-кілер. Термін «плазмід-кілер» стосується молекули нуклеїнової кислоти, що дає один з видів дріжджів зі здатністю нейтралізувати інші види дріжджів. Наприклад, дріжджові клітини роду *Kluyveromyces*, що містять плазмід-кілера, можуть запобігати росту дріжджів роду *Saccharomyces*. Таким чином, дріжджові клітини, що мають плазмід-кілера, можуть використовуватися для запобігання виникненню проблем зі споживанням в промислових процесах. У додаток до цього дріжджові клітини може бути наданий будь-який тип плазмід-кілера. Наприклад, плазмід-кілер, виділена із *K. lactis*, може бути надана

дріжджовій клітині *K. marxianus*. Дріжджові клітини, що містять плазмід-кілера, можуть бути легко ідентифіковані за допомогою загальновідомих способів, див., наприклад, [Gunge et al., J. Bacteriol., 145(1):382-390 (1981); Gunge and Kitada, Eur. J. Epidemiol., 4:409-414 (1988) та Wesolowski-Louvel et al., Nonconventional yeasts in Biotechnology: *Kluyveromyces lactis*, ed. Klaus Wolf, Springer verlag, Berlin, p.138-201 (1996)].

Подібним чином будь-яка із запропонованих тут дріжджових клітин може містити екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з АТФ-азною активністю, модифікований так, що ця дріжджова клітина стає більш толерантною до навколишніх середовищ з низьким рН. Наприклад, дріжджова клітина може бути наділена АТФ-азою, яка ефективно підтримує низьку цитоплазматичну концентрацію протонів, коли міжклітинна концентрація протонів є високою. Такі поліпептиди можуть бути модифіковані за допомогою генної інженерії так, як описано в роботі [Morsomme et al., (EMBO J. 15:5513-5526 (1996))].

Слід зауважити, що будь-яка з описаних тут рекомбінантних дріжджових клітин може містити будь-яку комбінацію бажаних генетичних регуляторів. Наприклад, дріжджова клітина позитивного фенотипу дикої яблуні може містити екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з цитратліазною активністю, а також екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид з ферментативною активністю, що приводить до створення органічного продукту.

3. Підходящі організми

Для використання згідно з даним винаходом підходящими є найрізноманітніші організми. Крім того, дріжджові мікроорганізми негативного і позитивного фенотипів дикої яблуні, такі, як *Saccharomyces* sp., включаючи *S. cerevisiae* і *S. uvarum*, *Kluyveromyces*, включаючи *K. thermotolerans*, *K. lactis* і *K. marxianus*, *Pichia*, *Hansenula*, включаючи *H. polymorpha*, *Candida*, *Trichosporon*, *Yamadazyma*, включаючи *Y. stipitis*, або *Torulaspora pretoriensis*, організми широкого ряду мікробних видів можуть також служити в якості хазяїнів для вироблення молочної кислоти. Наприклад, такий організм, як *Rhizopus oryzae*, природний виробник молочної кислоти, може бути генетично модифікований на кислотну толерантність, підвищення виходу продукції і вироблення оптично чистої молочної кислоти. Організми *Aspergillus* spp. відомі також своєю здатністю виробляти різноманітні органічні кислоти, наприклад, лимонну кислоту, і переносити низьку рН. Способи генетичної модифікації *Aspergillus* spp. для вироблення молочної кислоти добре відомі. Крім того, грибки такі, як *Rhizopus* і *Aspergillus* spp., виробляють ферменти, котрі дозволяють їм розкладати крохмаль та інші полімерні вуглеводи на мономерні вуглеводи для застосування їх у якості вуглецевого джерела.

У розрахунку на вироблення молочної кислоти були та можуть генетично модифіковані такі прокаріоти, як *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* і *Bacillus* spp. Мікроорганізми, які були ідентифіковані як *Bacillus coagulans*, є також природними виробниками молочної кислоти і можуть далі гене-

тично модифікуватися на поліпшення вироблення молочної кислоти в умовах низького pH.

Крім того, екстремофільні організми родини *Archaea* можуть переносити дуже низькі pH і високі температури. Генетичні модифікації деяких видів з цієї родини можуть давати штами для вироблення молочної кислоти.

4. Генетичні аспекти

Молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з ферментативною активністю, можна ідентифікувати й одержувати у будь-який спосіб. Наприклад, для визначення того, чи має дана нуклеїнова кислота будь-яку гомологію послідовностей з відомими ферментативними поліпептидами, можуть застосовуватися стандартні методи секвенування нуклеїнових кислот і комп'ютерні програми, що транслюють нуклеїноокислотні послідовності в амінокислотні послідовності на основі генетичного коду. Для порівняння різноманітних послідовностей можуть застосовуватися програми порівнювального аналізу послідовностей, наприклад, MEGALIGN® (DNASTAR, Madison, WI, 1997). Крім того, молекули нуклеїнових кислот, що кодують відомі ферментативні поліпептиди, можуть бути мutowані за допомогою загальновідомих способів молекулярного клонування (наприклад, сайт-спрямованого мутагенезу). До числа можливих при цьому мутацій входять, але не обмежуючись лише ними, делеції, інсерції, заміни основ, а також різноманітні комбінації делецій, інсерцій і заміни основ. Крім того, для ідентифікації нуклеїноокислотної послідовності, що кодує поліпептид з ферментативною активністю, можуть використовуватися нуклеїноокислотні і амінокислотні бази даних (наприклад, GenBank®). При цьому в якості запиту для пошуку у базі даних GenBank® може бути використана будь-яка амінокислотна послідовність, котра має деяку гомологію з поліпептидом, що має ферментативну активність, або будь-яка нуклеїноокислотна послідовність, що має певну гомологію з послідовністю, котра кодує поліпептид з ферментативною активністю. Ідентифіковані таким чином поліпептиди можуть бути проаналізовані для визначення того, чи вказують вони ферментативну активність.

Молекули нуклеїнових кислот, що кодують даний поліпептид з ферментативною активністю, можуть бути ідентифіковані й одержані за допомогою загальновідомих способів молекулярного клонування або хімічного синтезу нуклеїнових кислот, включаючи PCR (полімеразно-ланцюгову реакцію). Терміном «PCR» тут називають спосіб, за допомогою якого цільову нуклеїнову кислоту ампліфікують так, як описано в патенті США №4,683,195, а також описані тут подальші модифікації цього способу. У загальному випадку для конструювання олігонуклеотидних праймерів, що є ідентичними або подібними за послідовністю протилежним ланцюгам потенційного темплату, що піддається ампліфікуванню, використовуються дані про послідовності з кінців потрібної ділянки або за їх межами. За допомогою PCR нуклеїноокислотна послідовність може бути ампліфікована від РНК або ДНК. Наприклад, нуклеїноокислотна послідовність може бути виділена шляхом PCR-ампліфікації із всієї клітинної РНК, всієї геномної ДНК і кДНК, а

також із послідовностей бактеріофагів, послідовностей плазмід, послідовностей вірусів і под. У разі використання РНК у якості джерела темплату для синтезу комплементарних ланцюгів ДНК може застосовуватися зворотна транскриптаза.

Далі, для ідентифікації й одержання молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з ферментативною активністю, можуть застосовуватися методи гібридизації нуклеїнових кислот. У якості зонда для ідентифікації подібної молекули нуклеїнової кислоти шляхом гібридизації за умов у діапазоні від помірних до жорстких можуть використовуватися будь-які молекули нуклеїнових кислот або їхні фрагменти, що кодують відомий ферментативний поліпептид. Такі подібні молекули нуклеїнових кислот можуть виділятися, піддаватися секвенуванню і аналізуватися для визначення того, чи має кодований поліпептид ферментативну активність.

Гібридизацію можна здійснювати шляхом Саузерн- або Нозерн-аналізу для ідентифікації послідовності ДНК або РНК відповідно, що гібридується з зондом. Зонд можна позначити радіоізотопом, наприклад, ³²P, ферментом, дигоксигеніном або біотинілюванням. Аналіз ДНК або РНК можна проводити з електрофоретичним розділенням на агарозному або поліакриламідному гелі, перенесенням на нітроцелюлозну, нейлонову або іншу підходящу мембрану і гібридизацією зі зондом за допомогою стандартних методів, добре відомих фахівцям у даній галузі і описаним у розділах 7.39-7.52 [Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY]. Зонд, як правило, має довжину принаймні близько 20 нуклеотидів. Наприклад, зонд, що відповідає 20-нуклеотидній послідовності і кодує цитратліазу свавця, може бути застосований для ідентифікації молекули нуклеїнової кислоти, що кодує грибовий поліпептид із цитроліазною активністю. Застосовуватися можуть також зонди довжиною як більше, так і менше, ніж 20 нуклеотидів.

Для введення екзогенної молекули нуклеїнової кислоти в клітини можуть застосовуватися будь-які підходящі способи. Фахівцям у даній галузі добре відомі численні способи введення нуклеїнової кислоти в дріжджові клітини. Серед них можна назвати, наприклад, трансформацію, електропорацію, кон'югацію і злиття протопластів, див., наприклад, [Ito et al., *J. Bacteriol.* 153:163-168 (1983); Durrens et al., *Curr. Genet.* 18:7-12 (1990); Becker and Guarente, *Methods in Enzymology* 194:182-187(1991)].

Слід зауважити, що екзогенна молекула нуклеїнової кислоти в дріжджовій клітині за даним винаходом може знаходитися у будь-якій відповідній формі. Наприклад, вона може бути інтегрована в геном клітини або витримуватися у стані епісоми. Іншими словами, клітина за даним винаходом може бути стабільним або перехідним трансформантом. Крім того, як зазначалося вище, запропоновані дріжджові клітини можуть містити одну або численні копії (наприклад, приблизно 5, 10, 20, 35, 50, 75, 100 або 150 копій) даної екзогенної молекули нуклеїнової кислоти.

Способи експресії амінокислотної послідовно-

сті із екзогенної молекули нуклеїнової кислоти добре відомі фахівцям у даній галузі. В число таких способів входить, наприклад, конструювання нуклеїнової кислоти таким чином, щоб регуляторний елемент стимулював експресію послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид. Як правило, регуляторними елементами є послідовності ДНК, які регулюють експресію інших послідовностей ДНК на рівні транскрипції. Отже регуляторними елементами можуть бути, без обмеження, промотори, енхансери, тощо. Що стосується способів експресії поліпептиду із екзогенної молекули нуклеїнової кислоти в дріжджах, то вони також добре відомі фахівцям у даній галузі. Наприклад, добре відомі конструкції нуклеїнових кислот, здатні експресувати екзогенні поліпептиди в *Kluveromycetes*, див., наприклад, [Патенти США №№ 4,859,596 і 4,943,529].

Як зазначалося вище, дріжджові клітини за даним винаходом містять екзогенну молекули нуклеїнової кислоти, яка, наприклад, кодує поліпептид з ферментативною активністю, що має результатом створення органічного продукту. Добре відомі способи ідентифікації клітин, які містять екзогенну нуклеїнову кислоту. В число таких способів входять, не обмежуючись лише ними, способи PCR і гібридизації нуклеїнових кислот, і серед них Нозерн- і Саузерн-методи аналізу. У деяких випадках для визначення того, чи містить дана клітина конкретну нуклеїнову кислоту, можуть застосовуватися методи імуногістохімії і біохімічні методи з виявленням експресії ферментативного поліпептиду, кодованого даною молекулою нуклеїнової кислоти. Наприклад, для визначення того, чи містить дана дріжджова клітина цей кодований фермент, може використовуватися антитіло, специфічне до даного кодованого ферменту. Далі, для визначення того, чи містить дана клітина молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує ферментативний поліпептид, можуть застосовуватися біохімічні методи з виявленням органічного продукту, виробленого в результаті експресії даного ферментативного поліпептиду. Наприклад, виявлення лактату після уведення екзогенної молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з лактатдегідрогеназною активністю, в дріжджову клітину, яка звичайно не експресує такий поліпептид, може означати, що ця дріжджова клітина не тільки містить уведену екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, але також експресує кодований ферментативний поліпептид із цієї уведеної екзогенної молекули нуклеїнової кислоти. Фахівцям у даній галузі добре відомі методи виявлення специфічної ферментативної активності або наявності даних органічних продуктів. Наприклад, наявність лактату може бути визначена так, як описано в роботі [Witte et al., J. Basic Microbiol. 29:707-716 (1989)].

Винаходом пропонується також конструкція нуклеїнової кислоти, що містить послідовність рекомбінації і вибрану послідовність. Використовуваний тут термін «послідовність рекомбінації» стосується будь-якої нуклеїнокислотної послідовності, що відповідає геномній послідовності, яка знаходиться усередині клітини. Описані тут послідовності рекомбінації можуть використовуватися для спрямування рекомбінаційних подій в процесі ге-

нерування нокаут-організмів. Іншими словами, послідовність рекомбінації може використовуватися для специфічного дезінтегрування локусу, що містить нуклеїнокислотну послідовність, яка кодує даний фермент. Термін «вибрана послідовність» включає у себе будь-яку нуклеїнокислотну послідовність. Як правило, вибрана послідовність кодує поліпептид з ферментативною активністю, що приводить до створення органічного продукту в клітині. Таким чином, конструкції нуклеїнових кислот за даним винаходом можуть використовуватися для усунення активності ендогенного ферменту і добавлення активності екзогенного ферменту в одну стадію. У більшості випадків вибрана послідовність знаходиться в послідовності рекомбінації таким чином, що вибрана послідовність закривається на кожному кінці даною послідовністю рекомбінації.

5. Вироблення органічного продукту і способи культивування

Даним способом пропонуються способи вироблення органічних продуктів за допомогою запропонованих дріжджових та інших мікробних клітин. Ці способи передбачають надання дріжджових клітин і культивування наданих дріжджових клітин в культурному середовищі таким чином, щоб утворювався органічний продукт (наприклад, гліцерол, акрилат, ксилоза, аскорбат, лактат, цитрат, ізоцитрат, α -кетоглутарат, сукциніл-СоА, сукцинат, фумарат, малат і оксалоацетат. В цілому культурне середовище і/або умови культивування можуть бути поділені на дві категорії: ті, що стимулюють клітинне дихання і/або вироблення біомаси, і ті, що знижують клітинне дихання. Як правило, культурне середовище і/або умови культивування, що стимулюють клітинне дихання, використовуються в ситуаціях, коли потребується швидкий ріст або коли вироблюваний органічний продукт не може бути одержаний без клітинного дихання. В число таких продуктів входять без обмеження продукти циклу Кребса, тощо. З іншого боку, культурне середовище і/або умови культивування, що знижують клітинне дихання, використовуються в тих ситуаціях, коли швидкий ріст не потребується або не є бажаним, або ж коли вироблюваний органічний продукт може бути одержаний без клітинного дихання. В число таких продуктів входять лактат, акрилат, ксилоза та інші. Використовуваний тут термін «стимулювання клітинного дихання» або «стимулювання вироблення біомаси» стосовно умов культивування означає, що умови культивування клітин підтримуються такими, щоб джерело вуглецю в культурному середовищі метаболізувалося переважно шляхом окисного дихання або для вироблення біомаси. Використовуваний тут термін «біомаса» означає суху масу організму. Використовуваний тут термін «переважно метаболізований для вироблення біомаси» означає, що на кожний грам витраченого (наприклад, принаймні 0,4, 0,45, 0,5 або 0,6 грами біомаси) джерела вуглецю (у формі карбогідрату) виробляється принаймні 0,3г біомаси. У загальному випадку на кожний грам джерела вуглецю виробляється приблизно від 0,3 до 0,6г біомаси. Способи визначення кількості біомаси (сухої маси клітин) в культурі добре відомі у даній галузі і включають у себе, наприклад, такі,

що описані в [Postma et al., "Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol., 53, 468-477 (1989); Kiers et al., "Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359", Yeast, 14, 459-469 (1998)]. Добре відомі також методи визначення кількості спожитого джерела вуглецю, серед яких можна назвати, наприклад, методи HPLC (рідинної хроматографії високої розрізняювальної спроможності).

Слід зауважити, що ефективність використання джерела вуглецю може залежати від самого джерела вуглецю і використовуваного організму. Отже у разі використання складного культурного середовища, яке включає у себе окрім карбогідратних також інші джерела вуглецю, кількість біомаси, вироблюваної на грам джерела вуглецю, все одно визначається лише як кількість біомаси, вироблюваної на грам спожитого карбогідратного джерела вуглецю.

У загальному випадку культурне середовище, що містить інгібітор клітинного дихання (наприклад, антимицин А, ціанід, азид), може зменшувати клітинне дихання, у той час як відсутність таких інгібіторів може клітинне дихання стимулювати. Подібним чином анаеробні умови культивування можуть зменшувати клітинне дихання, у той час як аеробні умови культивування можуть клітинне дихання стимулювати. Аеробними є такі умови, за яких кисень уводиться або постачається природним шляхом і служить у якості основи для респіраторного шляху процесу перетворення. Взагалі, термін «аеробний» стосується умов культивування, за яких культурне середовище витримується в потоці повітря величиною принаймні 0,1 WM (об'єм повітря/об'єм рідини/хвилина) (наприклад, більше ніж 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 WM). Якщо замість повітря використовується інший газ, то номінальна величина WM встановлюється на рівень повітряного еквівалента, який визначається кількістю кисню в газі. В альтернативному варіанті культурне середовище може визначатися як «аеробне», якщо вміст у ньому розчиненого кисню складає принаймні 2% (наприклад, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 80%) відносно його кількості за насичених умов культивування у повітрі під атмосферним тиском.

Анаеробними є такі умови культивування, за яких респіраторний процес перетворення умісне або природним шляхом практично позбавляється кисню, що приводить, наприклад, до вироблення такого відновленого продукту, як етанол. Взагалі, умови, за яких культурне середовище містить розчинений кисень (DO: dissolved oxygen) у кількості менше, ніж приблизно 2,0% (наприклад, менше ніж приблизно 1,5, 1,0 або 0,5% або дорівнює приблизно 0%), вважаються анаеробними. Подібним чином умови, де WM (об'єм повітря/об'єм рідини/хвилина) є менше ніж приблизно 0,1 (наприклад, менше ніж приблизно 0,05 або дорівнює приблизно 0), розглядаються як анаеробні. Під використовуваним тут по відношенню до WM терміном «повітря» мається на увазі атмосферне повітря. До інших умов культивування, які можуть впливати на клітинне дихання, належать, не об-

межуючись лише ними, pH, температура і наявність певних джерел вуглецю (наприклад, глюкози). Слід зауважити, що деякі культурні середовища і/або умови культивування, які стимулюють клітинне дихання дріжджів одного виду, можуть зменшувати клітинне дихання дріжджів іншого виду. Наприклад, наявність глюкози в культурному середовищі зменшує клітинне дихання дріжджових клітин позитивного фенотипу дикої яблуні, але при цьому мало впливає або зовсім не впливає на клітинне дихання дріжджових клітин негативного фенотипу дикої яблуні.

Керована зміна умов культивування у промисловому виробничому процесі може, згідно з вищевикладеним, являти собою важливу стадію у досягненні оптимальних рівнів бажаного органічного продукту. Звичайно, дріжджова клітина згідно з даним винаходом вирощується за умов культивування, що стимулюють клітинне дихання у розрахунок на вироблення суттєвої клітинної густини. Наприклад, дріжджові клітини можуть поміщуватися в посудину для культивування і в достатку забезпечуватися глюкозою і киснем. Звичайно, за умов, що стимулюють клітинне дихання, час дуплікації для запропонованих тут мікроорганізмів складає менше ніж приблизно 10 годин (наприклад, менше ніж приблизно 8, 5 або 3 години). Як тільки клітини досягають значної густини, умови культивування можуть бути змінені на такі, що знижують клітинне дихання таким чином, щоб вироблявся органічний продукт, який не потребує клітинного дихання. Наприклад, дріжджові клітини можуть бути перенесені в посудину для культивування і забезпечені у достатку глюкозою, але без кисню. У цьому випадку керована зміна умов культивування з аеробних на анаеробні може привести до вироблення оптимальних кількостей бажаного органічного продукту. В альтернативному варіанті культивування клітин може проводитися лише за умов, що стимулюють клітинне дихання так, що виробляється органічний продукт, який клітинне дихання потребує. Слід зауважити, що клітинна маса у посудині для культивування звичайно становить більше 2г/л (наприклад, більше ніж приблизно 4, 6 або 8г/л).

В процесі культивування температура може складати більше 35°C (наприклад, більше ніж приблизно 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 або 45°C). Крім того, культурним середовищем може бути рідина. Культурне середовище, звичайно, містить джерело вуглецю. У загальному випадку джерело вуглецю включає у себе сировинні матеріали, що містять вуглеводи. Звичайно, живильне середовище містить також джерело азоту. У кращому варіанті джерело азоту включає у себе комбінацію органічних і неорганічних азотовмісних сполук.

Можливий робочий режим з наповненням великої ферментаційної посудини культурним середовищем, в яке входять всі потрібні живильні речовини і всі вуглеводні у кількості, достатній як для вироблення біомаси, так і для вироблення бажаного продукту. Посудина може працювати в умовах, де спочатку стимулюється вироблення біомаси, наприклад, шляхом створення аеробних умов з наступною зміною їх на анаеробні умови для вироблення бажаного продукту.

В іншому робочому режимі може використовуватися мала посудина для вироблення біомаси з високим рівнем живильних речовин і достатньою кількістю вуглеводу для продукування, наприклад, 100г/л біомаси. Вміст цієї посудини після цього можна перенести до більшої посудини з другим культурним середовищем, яке містить меншу кількість живильних речовин, наприклад, лише глюкозу в якості джерела вуглецю або інше вуглеводне джерело вуглецю у воді. Ця посудина може працювати в анаеробних умовах для вироблення бажаного органічного продукту. Ріст біомаси при цьому зменшується завдяки зниженню рівня живильних речовин і анаеробним умовам.

У кращому варіанті здійснення винаходу живильне середовище містить лише потрібні матеріали з метою спрощення видобування цільового продукту. Використання аеробного росту дозволяє використовувати спрощене культурне середовище порівняно з тим, що потребується при рості в анаеробних умовах. Багато з описаних тут дріжджів можуть культивуватися в аеробних умовах у середовищі, що складається лише із цукру, неорганічного джерела азоту, слідів мінералів і деяких вітамінів.

Перед тим як в результаті ферментації чи інших процесів в культурному середовищі добавляється органічний продукт, це культурне середовище, зазвичай, має рН у межах приблизно від 5,0 до 7,0. Проте, як тільки в культурне середовище мікроорганізмом секретуються органічні продукти, такі як органічні кислоти, рН культурного середовища отримує тенденцію до зменшення. Використовуваний тут термін «органічний рН» стосується рН культурного середовища, який визначається наявними у середовищі органічними сполуками, якими є, наприклад, вуглеводи і, зокрема, молочна кислота. Термін «неорганічний рН» стосується рН, відповідальними за який є неорганічні сполуки, таких, наприклад, як HCl і H₂SO₄. Культурне середовище може мати величину органічного рН менше ніж приблизно 3,0 (наприклад, менше ніж приблизно 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6 або 1,5) або величину неорганічного рН менше ніж приблизно 3,0 (наприклад, менше ніж приблизно 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6 або 1,5). В процесі культивування може використовуватися будь-яке джерело вуглецю. Наприклад, використовуватися може середовище, що містить пентозу (наприклад, рібозу, арабінозу, ксилозу і ліксозу). Крім того, можна використовувати середовище, що містить гідролізат маїсового волокна. Гідролізат маїсового волокна може мати величину рН у межах від 2,0 до 6,5. Зазвичай, гідролізат маїсового волокна містить глюкозу, ксилозу й арабінозу. Наприклад, вміст в ньому глюкози може складати приблизно 40г/л, ксилози - приблизно 40г/л і арабінози - приблизно 20г/л.

У великомасштабних промислових процесах використовуватися може ціла низка способів. Один з них полягає в тому, що в бак великої ємності (наприклад, 50, 100, 200 і більше галонів) з відповідним культурним середовищем, що містить, наприклад, гексозне і/або пентозне джерело вуглецю, інокують певний мікроорганізм. Після

інокуляції умови культивування регулюють таким чином, щоб джерело вуглецю використовувалося переважно для вироблення біомаси. Наприклад, культурне середовище може бути відрегульоване на величину рН приблизно 7,0, температуру приблизно 35°C і вміст розчиненого кисню, що створює анаеробне середовище в усьому баку. Слід зауважити, що бажаний органічний продукт може вироблятися на цій фазі продукування біомаси. По досягненні достатньої кількості біомаси бульйон з мікроорганізмами може бути перенесений до другого баку. Другий бак може мати будь-які розміри, за потребою, - більше, менше, або таких самих розмірів, що й перший бак. Зазвичай, другий бак є більшим ніж перший у тому розрахунку, щоб до бульйону з першого баку можна було добавляти додаткове культурне середовище. Окрім цього, культурне середовище в другому баку може бути таким самим, що й в першому баку, або відрізнятися від нього. Наприклад, перший бак може містити середовище з ксилозою й арабінозою, а другий - середовище з глюкозою.

Після перенесення культурного середовища у другий бак умови культивування можуть бути відрегульовані так, щоб джерело вуглецю використовувалося, головним чином, на вироблення органічного продукту, який поряд з іншими речовинами може включати у себе продукти переробки пірувату і двоокис вуглецю (CO₂), але не містити біомаси (тобто сухої маси клітин). Використовуване тут словосполучення «виробляти, головним чином, вибраний органічний продукт» або «вибраний продукт переробки пірувату» стосовно умов культивування означає, що джерело вуглецю в культурному середовищі піддається метаболічному перетворенню, як правило, шляхом ферментації (хоча і не обов'язково) для створення принаймні 0,5г органічного продукту на грам спожитого джерела вуглецю (наприклад, принаймні 0,6, 0,75 або 0,8г органічного продукту). Способи визначення кількостей виробленого органічного продукту і/або спожитого джерела вуглецю добре відомі і включають у себе, у тому числі, наприклад, HPLC.

Як зазначалося вище, ефективність використання джерела вуглецю може варіювати залежно від використовуваних основи і організму. Отже, у разі використання комплексного середовища росту, яке включає у себе інші, ніж вуглеводи, джерела вуглецю (наприклад, амінокислоти), кількість вироблюваного органічного продукту або продукту переробки пірувату на грам спожитого джерела вуглецю буде визначатися лише кількістю органічного продукту або продукту переробки пірувату, виробленого на грам спожитого вуглеводного джерела вуглецю. Краще, якщо на цій стадії виробляється не більше ніж 0,3г біомаси на грам джерела вуглецю (наприклад, не більше ніж 0,2, 0,1 або 0,05г біомаси).

Культурне середовище може бути відрегульоване, наприклад, на такий вміст розчиненого кисню, щоб створювати анаеробне середовище в усьому баку, або щоб містити інгібітор клітинного дихання. Крім того, культурне середовище може бути відрегульоване так, щоб підтримувати задану величину рН (наприклад, кислотну, нейтральну або основну). В альтернативному варіанті величини

на рН середовища для культивування може також регулюватися періодично, без підтримання будь-якого її конкретного рівня. Зазвичай, при виробленні органічної кислоти величина рН культурного середовища підтримується на рівні вище, ніж принаймні 1,5 (наприклад, принаймні 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 або 7,0). Далі, в процесі катаболічного перетворення мікроорганізмами наданих вуглецевих джерел температура в баку підвищується. Отже культурне середовище може бути відрегульоване так, щоб підтримувати задану температуру. Температура культурного середовища може також регулюватися періодично без підтримання заданого рівня. Зазвичай, у разі використання теплочутливих мікроорганізмів температура культурного середовища підтримується на рівні менше ніж приблизно 35°C (наприклад, менше ніж приблизно 34, 33, 32, 31 або 30°C), у той час як при використанні нечутливих до тепла мікроорганізмів температура середовища підтримується меншою ніж 45°C (наприклад, менше ніж 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36 або 35°C). Слід зауважити, що біомаса може вироблятися на цій фазі вироблення органічного продукту. Крім того, умови культивування у другому баку можуть бути змінені один раз або змінюватися багаторазово так, щоб виробляти не продукт, а біомасу, і навпаки. Наприклад, умови культивування в другому баку можуть бути анаеробними більшу частину часу з коротким імпульсним постачанням розчиненого кисню так, щоб періодично створювалися аеробні умови.

Згідно з іншим способом умови культивування можуть змінюватися так, щоб підвищувати метаболічну енергію мікроорганізму, що культивується, наприклад, шляхом добавлення кінцевого акцептора електронів. Використовуваний тут термін «метаболічна енергія» стосується енергії (вираженої в АТФ), видобутої даним організмом із енергетичного джерела (наприклад, вуглецевого). За тих самих умов кількість метаболічної енергії, отриманої організмом через метаболізм джерела вуглецю, є більшою ніж кількість енергії, отриманої від того самого джерела вуглецю за інших умов.

Живі клітини є високоупорядкованими і повинні забезпечувати в собі порядок для того, щоб вижити і рости. Для підтримання порядку усередині організму в ньому кожної миті відбуваються тисячі різноманітних хімічних реакцій. Наприклад, клітинам потрібна енергія для реакцій біосинтезу, наприклад, таких, як реакції полімеризації ДНК, РНК і білків, і для утворення метаболічних продуктів. Клітинам потрібна також енергія для постачання в клітини субстратів, утримання метаболітів, підтримання відповідного тургорного тиску і внутрішнього рН, а також для забезпечення рухомості.

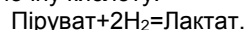
Оскільки енергія не може бути ні створена, ні зруйнована, клітинам для підтримання порядку потрібно уводити її із навколишнього середовища. Енергія із навколишнього середовища постачається у формі електромагнітного випромінювання або хімічної енергії. Енергія, отримана із навколишнього середовища, використовується клітиною за одним з двох загальних біохімічних механізмів - фосфорилування рівня субстрату і електронного переносу.

У загальному випадку, за анаеробних умов АТФ («клітинна валюта» за енергію) виробляється шляхом фосфорилування рівня субстрату. В результаті фосфорилування рівня субстрату енергія звільнюється із хімічних зв'язків і накопичується, головним чином, у формі АТФ.

У якості утворення рівня субстрату може служити перетворення глюкози на піруват шляхом гліколізу:

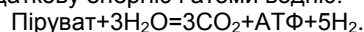


Піруват після цього може перетворюватися на молочну кислоту:

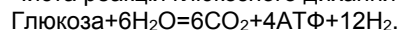


Чиста енергія, вироблена в результаті цих перетворень, є еквівалентною 2 АТФ.

Далі піруват може бути підданий переробці у трикарбонокислотному (ТСА) циклі і генерувати додаткову енергію і атоми водню:



Чиста реакція глюкозного дихання має вигляд:



Таким чином, шляхом фосфорилування рівня субстрату повне респіраційне перетворення глюкози на CO_2 дає чисту енергію, еквівалентну 4 АТФ і 24 атомам водню.

У механізмі «електронного перенесення» окисно-відновні потенціали сполук, що складають члени «ланцюга електронного перенесення», зрівноважуються так, що кожний член може відновлюватися відновленою формою попереднього члена. Отже відновна сила, як і електрони, може проходити через ланцюг носійних молекул до кінцевого акцептора електронів, яким може бути кисень (O_2), нітрат (NO_3) і фумарат. Добавлення кінцевого акцептора електронів, тобто кисню, нітрату або фумарату, в культурне середовище може дати мікроорганізму підвищену метаболічну енергію (наприклад, збільшене вироблення АТФ за тої самої кількості спожитого вуглецевого джерела). Найкращим кінцевим акцептором електронів є кисень.

Якщо в якості кінцевого акцептора електронів використовується кисень, то водень може бути перепущений через ланцюг електронного перенесення і надати клітині додатково 1,5 АТФ на атом водню і 4 АТФ на атом кисню. У загальному випадку кількість метаболічної енергії може визначатися шляхом вимірювання відношення кількості спожитого кисню до кількості спожитої глюкози. В Табл.1 наведені дані максимального і мінімального поліпшення енергетичного виходу (молі АТФ на молі глюкози) при добавленні кисню в процесі вироблення в залежності від виходу продукту, який знижується внаслідок втрати пірувату на ТСА-цикл (а отже на дихання). Максимальне поліпшення у відсотках було одержане, припускаючи, що відношення Р/О складає 3, у той час як мінімальне поліпшення припускає величину Р/О=0,5. В Табл.2 показана оцінена максимальна кількість кисню, витраченого на моль спожитої глюкози. Добавлення кисню може стимулювати мінімальний ріст, що буде ізолювати вуглець для біосинтезу, залишаючи невелику його кількість для дихання (а отже для використання кисню).

Таблиця 1

Вихід продукту (лактат/глюкоза, г/г)	Максимальне поліпшення енергетичного виходу, %	Мінімальне поліпшення енергетичного виходу, %
1,0	0%	0%
0,9	160%	35%
0,8	320%	70%
0,7	480%	105%
0,6	640%	140%
0,5	800%	175%
0,4	960%	210%
0,3	1120%	245%
0,2	1280%	280%
0,1	1440%	315%
0,0	1600%	350%

Таблиця 2

Вихід продукту (лактат/глюкоза, г/г)	Моль кисню на моль глюкози
1,0	0,0
0,9	0,6
0,8	1,1
0,7	1,6
0,6	2,1
0,5	2,6
0,4	3,1
0,3	3,6
0,2	4,1
0,1	4,6
0,0	5,1

Таким чином, для поліпшення метаболічної енергії мікроорганізмів у клітинній культурі в цю культуру в якості кінцевого акцептора електронів може добавлятися кисень. Тоді як максимальний молярний вихід молочної кислоти із глюкози складає 2 моль лактату на моль глюкози, а молярний вихід АТФ із глюкози складає 2 моль АТФ на моль глюкози, добавлення кисню в якості кінцевого акцептора електронів дозволяє певну кількість пірувату скеровувати в лимонно-кислотний (ТСА) цикл, де він перетворюється на CO_2 і енергію. Отже постачання кінцевого акцептора електронів «підвищує метаболічну енергію» мікроорганізму.

Відведення пірувату в ТСА-цикл переводить до зниження кількості інших продуктів переробки пірувату (таких, як молочна кислота). Наприклад, 10% зниження виходу може привести до генерування у 2,6 рази більшої кількості метаболічної енергії для даного мікроорганізму, 20% зниження виходу може привести до генерування у 4,2 рази більшої кількості метаболічної енергії для даного мікроорганізму, а 50% зниження виходу може привести до генерування 9-кратно більшої кількості метаболічної енергії для даного мікроорганізму.

Можна очікувати, що на більш пізніх стадіях процесу, коли з'являються високі рівні метаболічних продуктів, наприклад, молочної кислоти, клітина може потребувати більшої кількості метаболічної енергії для підтримання функціонування.

Таким чином, для мікроорганізмів в анаеробному культурному середовищі може стати потріб-

ним постачати короткими імпульсами розчинений кисень. Краще, якщо «постачання короткими імпульсами розчиненого кисню» створює культурне середовище з концентрацією розчиненого кисню не більше 0,5 відсотка, а ще краще, якщо в межах приблизно від 0,1 до 0,5 відсотка. В альтернативному варіанті швидкість росту або клітинне утримання мікроорганізмів в процесі анаеробної ферментації можуть бути прискорені додаванням інших кінцевих акцепторів електронів, якими є, наприклад, нітрат або фумарат. Кисень при цьому додається в кількостях, як раз достатніх для збільшення метаболічної енергії мікроорганізму за підтримання продуктивності на бажаному рівні. При цьому повинні бути прийняті заходи щодо уникнення надмірного зниження виходу. Цей метод може бути застосований також для того, щоб поліпшити споживання залишкових цукрів і тим самим ще більше спростити процес відновлення.

6. Способи очищення органічного продукту

Для відділення виробленого продукту можуть застосовуватися будь-які підходящі способи. Наприклад, для видалення біомаси з живильного бульйону можуть застосовуватися загальновідомі способи розділення, а для видобування органічного продукту із живильного бульйону без мікроорганізмів можуть застосовуватися загальновідомі способи відокремлювання (наприклад, екстрагування, дистиляції й іонного обміну), див., наприклад, [Патент США №4,275,234, Патент США №5,510,526, Патент США №5,831,122, Патент США №5,641,406 і Міжнародна патентна заявка № WO 93/00440. Крім того, цільовий органічний продукт може відокремлюватися від живильного бульйону як під час його вироблення, так і по закінченні стадії вироблення. Слід зауважити, що умови культивування у другому баку можуть регулюватися таким чином, щоб процес відокремлювання поліпшити. Наприклад, рН і температуру в другому баку можна відрегулювати таким чином, щоб цільовий органічний продукт преципітував із розчину, або приймав форму, більш підходящу для відокремлювання. Зокрема, величина рН органічних кислот може сприяти преципітації із розчину, коли рН бульйону є меншим за величину pK_a для органічної кислоти. Наприклад, умови культивування при виробленні глутамінової кислоти можуть бути такими, що рН буде складати менше 2,19, тобто менше величини pK_a для глутамінової кислоти. Таким чином, регулювання рН, температури і вмісту живильного бульйону може полегшувати відокремлювання органічного продукту. Крім того, можуть вибиратися генетично відрегульовані для конкретного процесу дріжджі, а специфічні умови культивування можуть бути відрегульовані таким чином, щоб побічні продукти в живильному бульйоні не перешкоджали видобуванню цільового органічного продукту.

Зрозуміло, що описані тут способи і матеріали можуть бути пристосовані і використовуватися в процесах культивування будь-якого типу, включаючи без обмеження такі загальновідомі процеси, як «безперервна ферментація» і «періодична ферментація». Крім того, мікроорганізми, використовувані у виробничому процесі, можуть піддаватися відновленню і використовуватися знову у наступ-

них виробничих процесах. Наприклад, для вироблення бажаного органічного продукту одні й ті самі мікроорганізми можуть використовуватися багато разів. Стосовно джерела вуглецю немає жодних обмежень, і для вироблення як біомаси, так і бажаного органічного продукту можуть використовуватися у якості джерела вуглецю, наприклад, алоза, альтроза, глюкоза, маноза, гулоза, йодоза, галактоза, талоза, мелібіоза, сахароза, фруктоза, рафіноза, стахіоза, рібоза, арабіноза, ксилоза, ліксоза, крохмаль, наприклад, маїсовий крохмаль і пшеничний крохмаль, і гідролізати, якими є, наприклад, гідролізати маїсового волокна та інші целюлозні гідролізати. Крім того, живильне середовище також може бути будь-якого підходящого типу. Наприклад, застосовувати можна стандартне культурне середовище (наприклад, дріжджове мінімальне середовище і середовище YP (дріжджовий екстракт 10г/л, лептонний бульйон 20г/л)), а також такі середовища, як маїсова мерсеризаційна вода і маїсовий мерсеризаційний луг.

Суттєвою перевагою даного винаходу є те, що кращим мікроорганізмам і, зокрема, вирощуваним за аеробних умов, може потребуватися мінімальна кількість культурного середовища. Анаеробне вироблення, як правило, не потребує додаткових живильних речовин, і, таким чином, кінцевий продукт може бути відокремлений від відносно чистого ферментаційного бульйону будь-яким відповідним шляхом. Для відділення органічних кислот від ферментаційних бульйонів може застосовуватися добре відома технологія екстрагування рідких речовин рідинами і забезпечувати при цьому високий ступінь очищення. Але даний винахід дозволяє застосовувати також більш прості, менш дорогі і менш енергоємні способи.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу використовуються генетично модифіковані дріжджі негативного фенотипу дикої яблуні у послідовному процесі з «переключенням» метаболічного шляху по досягненню критичної густини клітин, коли потребується різкий зріст питомої продуктивності вироблення бажаного органічного продукту. Для переключення метаболічного шляху процесу, як правило, використовується перенесення біомаси із високоаерованої посудини у практично анаеробну посудину, що викликає кисневе голодування. Слід зауважити, що в якості джерела вуглецю як у фазі росту, так у фазі вироблення продукту може використовуватися загальний вуглевод (наприклад, глюкоза або ксилоза). Для успішного здійснення даного варіанту використання генетично модифікованих дріжджових клітин негативного фенотипу дикої яблуні може стати вирішальним фактором. Крім того, питома продуктивність вироблення бажаного органічного продукту також може бути визначальною у досягненні позитивного результату. Використовуваний тут термін «питома продуктивність» окреслює кількість виробленого продукту і виражається в грамах органічного продукту, виробленого із граму біомаси (сухої маси) за годину, тобто г/(г·година). Звичай, питома продуктивність вироблення таких органічних продуктів, як лактат і акрилат, становить більше ніж приблизно 0,1 г/(г·година), наприклад, більше ніж приблизно 0,2 г/(г·година) або

більше ніж приблизно 0,5 г/(г·година). Завдяки високій питомій продуктивності процесів, здійснюваних згідно з даним винаходом, енергія, необхідна для підтримання клітин, може одержуватися шляхом ферментації за практично анаеробних умов, не звертаючись до аерації для генерування великих кількостей енергії респіраторним шляхом. Слід зауважити, що практично анаеробні посудини аеруються з витратою менше ніж приблизно 0,1 WM. В деяких робочих ситуаціях аерація не потребується. Крім того, вихід продукту (тобто грам органічного продукту на грам спожитого джерела вуглецю) у даному варіанті здійснення, як правило, становить більше ніж приблизно 70% (мас.) і забезпечується без добавлень таких вуглецевих джерел, як етанол і ацетат. У деяких випадках для досягнення питомої продуктивності, достатньої для генерування енергії, потрібної для підтримання клітин, може бути потрібним, крім того, підсилювати шлях процесу від глюкози до пірувату для забезпечення процесу вироблення бажаного продукту необхідними ферментами.

В іншому варіанті здійснення послідовний виробничий процес може бути спроектований таким чином, щоб можливістю стерилізувати була наділена лише високоаерована посудина росту. Анаеробна культивуальна посудина працює при температурах, як правило, вище ніж приблизно 35°C (наприклад, вище 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 або 45°C). Мало які дріжджі дикої типу зможуть вижити і конкурувати з генетично модифікованими дріжджами за таких температур, оскільки рН в процесі вироблення продукту падає. Головною причиною цього є те, що вони не мають шляху підсиленої ферментації, який може генерувати потрібну для утримання клітин енергію. Крім того, дріжджі можуть бути модифіковані так, щоб містити «плазмідні-кілери», описані вище, які здатні запобігти виживанню дріжджів інших видів.

Винаходом пропонуються також різноманітні способи культивування дріжджових клітин. Наприклад, дріжджова клітина негативного фенотипу дикої яблуні може культивуватися в живильному середовищі як з величиною органічного рН менше приблизно 3,0, так і такого, що містить гідролізат маїсового волокна. Серед інших способів культивування дріжджових клітин можна назвати, наприклад, культивування дріжджових клітин негативного фенотипу дикої яблуні при температурі більше, ніж приблизно 35°C, у живильному середовищі, яке або має величину неорганічного рН менше приблизно 3,0 або містить пентозу чи гідролізат маїсового волокна.

Винаходом пропонується також спосіб одержання органічного продукту. Цей спосіб включає у себе вирощування мікроорганізму в умовах культивування і зміну цих умов культивування на такі, що стимулюють вироблення органічного продукту. В даному способі мікроорганізм має знижену піруватдекарбоксилазну, алкогільдегідрогеназну, альдегіддегідрогеназну і/або ацетил-CoA-синтазну активність і виказує швидкість росту за відсутності етанолу й ацетату, яка складає принаймні 30% (наприклад, приблизно 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200% або більше) від тієї, що спостерігається у відповідного мікроорганізму, який не має зниженої

піруватдекарбоксилазної, алкогольдегідрогеназної, альдегіддегідрогеназної і/або ацетил-СоА-синтазної активності. Умови культивування, що стимулюють клітинне дихання, як правило, використовуються в тих ситуаціях, де потребується швидкий ріст або де бажаний органічний продукт не може вироблятися без клітинного дихання, у той час як умови культивування, що знижують клітинне дихання, використовуються в тих ситуаціях, де швидкий ріст не потребується або де бажаний органічний продукт може вироблятися без клітинного дихання.

Нижче наведені приклади, які ілюструють даний винахід, не обмежуючи його об'єму, визначеною Формулою винаходу.

Приклади

Приклад 1. Рекombінантна плазмiда рНЕС/рSЕН

Описана в [Chien et al. (Proc. Nat'l Acad Sci., 88(21):9578-9582 (1991))] плазмiда рGAD424 у кількості 0,5мкг була перетравлена ферментом рестрикції HindIII. Перетравлену суміш відділили за допомогою гель-електрофорезу на 0,8% агарозному гелі з використанням TBE-буферу. Після цього від гелю був очищений 5,9 kbp фрагмент, як описано в [Sambrook et al., Molecular Cloning, second edition. Cold Spring harbor Laboratory, Plainview, NY (1989)]. Була розроблена комплементарна пара 92 bp синтетичних олігомерів з численними сайтами розпізнавання ферменту рестрикції. Перший з них був позначений fwd hes oligo і мав таку послідовність: 5'-CCCAAGCTTGAATTCCCGGGGGATCCCTGCAGGGTACCACGCGTAGA TCTACTAGTGC GGCCGCTCGAGTCTAGAGGGC CCAAGCTTGGG-3' (SEQ. ID NO:1). Другий був позначений comp hes oligo і мав таку послідовність: 5'-CCAAGCTTGGGCGCTCTAGACTCGAGGCGGCGG CCACTAGTAGCTAC GCGTGGTACCCTGCAGGGATCCCCGGGGAATT CAAGCTTGGG-3' (SEQ. ID NO:2). Ці два комплементарні олігомери в кількості 500нмолів були піддані відпалюванню один з одним шляхом кип'ятіння протягом 10 хвилин з наступним поступовим охолодженням до кімнатної температури. Дволанцюгова 92 bp (пар основ) ДНК була перетравлена ферментом HindIII і лігвана з 5,9 kbp рGAD424, перетравленим HindIII. Ця суміш лігування була використана для трансформування клітин DH10B *E. coli* (електромаксимальні клітини Life Technologies, Rockville, MD) шляхом електропорації, як описано в [Sambrook et al., Molecular Cloning, second edition. Cold Spring harbor Laboratory, Plainview, NY (1989)]. Рекombінантні клітини *E. coli* були посіяні на планшети з бульйоном Luria-Bertani, і клітини, що містили плазмiду, були відібрані за допомогою 100мкг/мл ампіцилінового антибіотика. Плазмiдна ДНК була відділена від ампіцилінозистійких клонів *E. coli*, в результаті чого були отримані дві плазмiди рНЕС і рSЕН (Фіг.1 і 2). Ці плазмiди мали різні орієнтації синтетичного олігомеру відносно алкогольдегідрогеназного промотора ADH1 на векторі.

Приклад 2. PCR-ампліфікація нуклеїнової кислоти, що кодує лактатдегідрогеназу із *Lactobacillus*

helveticus і *Pediococcus acidilactici*

Із вирощуваних протягом ночі культур *Lactobacillus helveticus* (Американська колекція типових культур ATCC 10797) і *Pediococcus acidilactici* (ATCC 25741) виділили геномну ДНК за допомогою набору PUREGENE® для відокремлювання геномних ДНК (Gentra systems, Minneapolis, MN). Для виділення нуклеїнової кислоти, що кодує лактатдегідрогеназу, із геномних ДНК *L. helveticus* (lh-ldh oligos) і *P. acidilactici* (pa-ldh oligos), були сконструйовані PCR-праймери. Ці праймери конструювалися на основі генних послідовностей для лактатдегідрогеназ у базах даних Genbank і мали такі послідовності: 5' lh-ldh, 5'-CCGGGATCCATGGCAAGAGAGGAAAAACCTC-3' (SEQ. ID NO:3); 3' lh-ldh, 5'-CCAAGATCTTTATTGACGAACCTTAACGCCAG-3' (SEQ. ID NO:4); 5' pa-ldh, 5'-CCGGGATCCATGTCTAATATTCAAAATCATCAAAAAG-3' (SEQ. ID NO:5); і 3' pa-ldh, 5'-CCAAGATCTTTATTTGTCTTGTCTTTTCAGCAAG-3' (SEQ. ID NO:6). Праймери були оптимізовані за допомогою програми Primer Designer від фірми Sci-ed software (Durham, NC). Разом із 100нМ праймерів використовувався 1мкМ геномної ДНК. Для PCR-підсилювання лактатдегідрогеназної (LDH) нуклеїнової кислоти використовувалася ДНК-полімераза Pfu (New England Biolabs) так, як описано в [Sambrook et al., Molecular Cloning, second edition. Cold Spring harbor Laboratory, Plainview, NY (1989)].

Аналогічна методика використовувалася для виділення нуклеїнової кислоти, що кодує L-лактатдегідрогеназу, із геномної ДНК таких мікроорганізмів, як *Bacillus* sp., наприклад, *Bacillus megaterium* (ATCC 6458), *Rhizopus oryzae* (ATCC 76275) або будь-якого іншого організму, що продукує лактат (включаючи такі мікроорганізми, як гриби і бактерії, а також багатоклітинні організми, якими є, наприклад, ссавці) або із тканини організму, що продукує лактат. Геномну ДНК виділяли із вирощуваної культури організму за допомогою набору PUREGENE® для відокремлювання геномних ДНК (Gentra systems, Minneapolis, MN). Були сконструйовані відповідні PCR-праймери для виділення нуклеїнової кислоти, що кодує лактатдегідрогеназу, на основі LDH-генних послідовностей для цих видів, що є в базі даних Genbank. У загальному випадку разом із 100нМ відповідних праймерів використовували 1мкМ геномної ДНК. Для ампліфікації лактатдегідрогеназної (LDH) нуклеїнової кислоти із відповідної геномної ДНК використовувалася ДНК-полімераза Pfu (New England Biolabs) або будь-яка інша підходяща ДНК-полімераза і метод PCR, описаний, наприклад, в [Sambrook et al., Molecular Cloning, second edition. Cold Spring harbor Laboratory, Plainview, NY (1989)].

В альтернативному варіанті нуклеїнову кислоту, що кодує лактатдегідрогеназу, виділяли із *Kluyveromyces thermotolerans* ATCC 52709, *Trichoderma Reese*/ATCC 13631, *Torulaspora pretensis* ATCC 36245 або із будь-якого іншого організму, що продукує лактатдегідрогеназу, за будь-якої з таких методик.

1) Бібліотеку геномних кДНК із одного з цих організмів клонували в стандартний вектор експресії

pUC19 *E. coli* за допомогою стандартного методу [Sambrook et al., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]. Цією бібліотекою трансформували мутантний штам NZN111 *E. coli* (*ldh pfl*) [Bunch et al., (1997) "The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*," *Microbiology*, 143:187-95], і клітини вирощували в анаеробних умовах у середовищі M9, доповненому казаміною кислотою. Будь-яка *E. coli*, вирощувана в цих умовах, кодує або лактатдегідрогеназу чи є ревертантом *ldh*, або *pfl*. Позитиви (колонії, що утворюються в цих анаеробних умовах росту) відбирають за їхньою LDH-активністю за допомогою колориметричного аналізу специфічного до молочної кислоти м'якого агарового покриття (LASSO: lactic acid specific soft-agar overlay), здатного розрізняти (L)-LDH і (D)-LDH [Witte et al., *J. Basic Microbiol.* 29:707-716 (1989)]. Після цього із клонів, які за припущенням могли експресувати L-лактатдегідрогеназу, виділяли і секвенували плазмідну ДНК.

2) *K. thermotolerans* ATCC 52709, *T. reesei* ATCC 13631 і *Torulaspora pretoriensis* ATCC 36245 є еукаріотами, що продукують L-молочну кислоту при культивуванні в анаеробних умовах [Witte et al., *J. Basic Microbiol.* 29:707-716 (1989)]. Таким чином, згідно з даним способом принаймні один з цих штамів вирощували в анаеробних умовах для індукування лактатдегідрогеназної ферментативної активності. Далі, за допомогою стандартних способів одержували безклітинні екстракти, які піддавали очищенню у відомі способи очищення білка для відділення лактатдегідрогеназного ферменту. Підходящі для цього способи очищення лактатдегідрогенази описані, наприклад, в [Kelly et al., (1978) "Affinity chromatography of bacterial lactate dehydrogenases," *Biochem J*, 171(3):543-7]. Після очищення білка його частково розщепили і піддали очищенню для визначення амінокислотної послідовності. Отриману амінокислотну послідовність далі використовували у конструюванні дегенеративних праймерів для виділення гена, що кодує лактатдегідрогеназу із геномної ДНК.

Еукаріотична LDH, така, як виділена із *K. thermotolerans*, або *Trichoderma reesei*, або *Torulaspora pretoriensis*, може функціонувати краще (з погляду на транскрипційну ефективність, трансляційну ефективність і/або білкову активність) в дріжджах *K. marxianus* порівняно з LDH із бактеріальних джерел, якими є, наприклад, *Bacillus* або *Lactobacillus*.

3) Використовуючи відомі послідовності еукаріотичних лактатдегідрогеназних генів, отримувані із бази даних Genbank, конструювали дегенеративні праймери для виділення гена для лактатдегідрогенази із геномної ДНК еукаріотів *K. thermotolerans* ATCC 52709, *T. reesei* ATCC 13631 або *Torulaspora pretoriensis* ATCC 36245. Серед LDH-генних послідовностей для конструювання дегенеративних праймерів використовували консервовані сайти зв'язування NAD⁺ і консервовані сайти зв'язування пірувату. Разом із 100нмольями праймерів використовували 1мкМ

геномної ДНК. Для підсилення фрагментів L-лактатдегідрогеназної (LDH) нуклеїнової кислоти згідно з відомими PCR-методами, наприклад, описаними в [Sambrook et al., (*Molecular Cloning*, second edition, Cold Spring harbor Laboratory, Plainview, NY (1989))], використовували ДНК-полімеразу Pfu (New England Biolabs) або будь-яку іншу підходящу ДНК-полімеразу.

Приклад 3. Клонування *L. helveticus* і *P. acidilactici* у вектор pCRII

PCR-ампліфіковані LDH DNA-продукти були лігovanі з векторами pCRII (Фіг.3 і 4) за допомогою набору для клонування TA від фірми Invitrogen (Carlsbad, CA). Одержану суміш лігування використали для трансформування DH10B *E. coli* у спосіб, описаний в [Sambrook et al., *Molecular Cloning*, second edition. Cold Spring harbor Laboratory, Plainview, NY (1989)]. Вектори pCRII із вищезазначеного набору дозволяли швидко клонувати PCR-продукти згідно з рекомендаціями виробника. Вектори pCRII з LDH-генами із *L. Helveticus* і *P. Acidilactici* показані на Фіг.4.

Приклад 4. Реконбінантна плазміда pLh *ldh-HES*/pPa *ldh-HES* з LDH генами із *L. helveticus* і *P. Acidilactici* у векторі pHES

Вектори pCRII, що містили LDH ген із *L. helveticus* і *P. acidilactici*, були перетравлені відповідними ендонуклеазами рестрикції. Подібним чином такими самими ендонуклеазами рестрикції був перетравлений вектор pHES. Після цього до 6,0 kbp вектора pHES була лігвана 1 kbp вставка, що містила LDH із векторів pCRII, за допомогою ДНК-лігази T4, як описано в [Sambrook et al., *Molecular Cloning*, second edition. Cold Spring harbor Laboratory, Plainview, NY (1989)]. Отриману таким чином суміш лігування використали для трансформування DH10B (електромаксимальні клітини, Life Technologies, Rockville, MD) *E. coli*, і були вибрані реконбінантні клони для забезпечення стійкості до ампіциліну. ДНК, виділена із реконбінантних клонів, була проаналізована на підтвердження векторів pLh *ldh-HES* і pPa *ldh-HES* (Фіг.5). Ці вектори містять гени, що кодують LDH із *L. helveticus* і *P. acidilactici* у векторі pHES під керуванням дріжджового алкогольдегідрогеназного промотора (*ADH1*).

Приклад 5. Клонування LDH-гена *Bacillus sp.*, *Rhizopus oryzae*, *K. thermotolerans*, *Trichoderma reesei* або *Torulaspora pretoriensis* для експресії з використанням генного промотора *Saccharomyces PDC1*

Поряд з тим, що для керування експресією лактатдегідрогеназного гена, клонованого в *K. marxianus*, можна використовувати лактатдегідрогеназний промотор, що знаходиться в *Rhizopus oryzae*, *K. thermotolerans*, *Trichoderma reesei* або *Torulaspora pretoriensis*, для керування експресією виділеного лактатдегідрогеназного гена можна використовувати промотор PDC1 із *Saccharomyces cerevisiae*. Гліколітичні промотори із *Saccharomyces cerevisiae* з успіхом використовувалися для експресії генів в штаммах *Kluyveromyces* [Gellissen and Hollenberg, (1997) "Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review," *Gene*,

190(l):87-97].

Таким чином, промотор PDC1 із *Saccharomyces cerevisiae* отримують шляхом конструювання відповідних олигомерних праймерів, використовуючи геномну послідовність *Saccharomyces cerevisiae* із бази Genbank. Послідовність гена PDC1 і 1 Kb ділянки навколо гена PDC1 підсилюють за допомогою методів PCR. Отримуваний в результаті 4 Kb фрагмент ДНК містить як промотор, так і термінатори, що керують експресією гена PDC1. Між промотором і термінаторами, що керують експресією гена PDC1, включають численні сайти ферментів рестрикції так, щоб різноманітні LDH-гени могли вставлятися під контролем промотора PDC1 і термінаторів. 4 Kb фрагмент ДНК вставляють у відповідний вектор, яким є, наприклад, шатл-вектор із *Saccharomyces cerevisiae* або *E. coli* на основі pUC19. Після цього LDH-ген вводиться у вектор в одному з численних сайтів клонування під контролем промотора і термінаторів так, що експресія лактатдегідрогеназного гена контролюється промотором PDC1 і термінатором (Фіг.14). В альтернативному варіанті подібним чином для експресії клонованого LDH-гена в *K. marxianus* можуть використовуватися інші гліколітичні промотори *Saccharomyces*, наприклад, такі, що керують експресією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназних або фосфогліцераткіназних генів *Saccharomyces cerevisiae*.

Приклад 6. Ампліфікація лінійних фрагментів гомологічної ДНК для генних розривів піруватдекарбоксилази

Був сконструйований 82 bp олигомерний праймер (5'kmPDC1Ko), який містив 51 bp, ідентичних 5'-кінцю піруватдекарбоксилази (PDC) із *K. marxianus* і 30 bp, ідентичних 5'-кінцю промотора ADH1 із векторів pHES. Праймер 5'kmPDC1Ko мав таку послідовність:

5'-TAAACAGTACAATCGCAAAGAAAAGCTCCACACCCAA
AACCAATAATTGCAATGCAACTTCTTTCTTTTTT
TTTCTTTCT-3' (SEQ. ID NO:7). Послідовність для PDC-генів із дріжджів (*K. marxianus* або *Y. stipitidis* або *H. polymorpha*) була отримана із зазначеної послідовності від бази Genbank. Подібним чином був сконструйований зворотний 79 bp олигомер (3'kmPDC1Ko) так, що 54 bp його були ідентичними 3'-кінцю PDC-гена, а 22 bp - 3'-кінцю термінатора ADH1. Олигомер 3'kmPDC1Ko мав таку послідовність:

5'-TTATAAAATCATTAATAATCCAAAATCGTAATTTATCTCTTTATCCTCTCCCTCTCTACATGCCGGTAGAGGTGTGGTCA-3' (SEQ. ID NO:8). Були сконструйовані праймери для ампліфікації лінійного фрагмента ДНК із плазмід pLhdh-HES і pPaldh-HES таким чином, що цей фрагмент містив повний лактатдегідрогеназний ген разом із промотором ADH1 і термінатором (Фіг.6). PCR-ампліфікований продукт також мав кінці, гомологічні послідовностям із: PDC1 *K. marxianus*; PDC1 і PDC2 *Yamadazuma stipitidis*; PDC1 і PDC2 *Hansenula polymorpha*. Реакція ампліфікації була проведена з використанням ДНК-полімерази Pfu (New England Biolabs; Beverly, MA). В цій реакції разом з 5 одиницями полімерази і 100нмольями олигомерів використовувалися 100нг pLhdh-HES або pPaldh-HES.

Реакцію проводили згідно з протоколами, описаними в [Sambrook et al., Molecular Cloning, second edition. Cold Spring harbor Laboratory, Plainview, NY (1989)]. На Фіг.6б показаний кінцевий лінійний продукт з описаними гомологіями.

Для поліпшення подібності одержання негативного штаму pdc *K. marxianus* були приготовані додаткові конструкції. Для цього був виділений 5,5 kbp фрагмент навколо 1,7 kbp PDC1-гена *K. marxianus* (Фіг.6B) за допомогою методів PCR і геномної «прогулянки» (Clonetech). Після цього 5,5 kbp фрагмент за стандартними методами був клонований у вектор pCRII клонування із набору TA (Invitrogen). За допомогою гідролізатів рестрикції [Sambrook] із 5,5 kbp фрагмента *K. marxianus* була видалена частина довжиною приблизно 370 bp поблизу середини 1,7 kbp ділянки PDC1 кодування. Видалений фрагмент мав таку послідовність:

CCGGTCTCTTCTCTTACTCTTACAAGACCAAGAACATTGTGCAATTCACCTCCGACTA
CATCAAGGTGACAGAACGCCACTTTCAGGTGTCCAAATGAAGTTCGTCTTGCAAAA
GTTGTTGACCAAGGTCAAGGATGTGCTAAGGGTTACAAGCCAGTTCAGTCTCTCTCA
CGCTCCAAGAGACAACAAGCCAGTGTGCTGACTCTACTCCATTGAAGCAAGATGGGT
CTGGACTCAAGTCCGTAAGTTCCTACAAGAGGTGATGTTGTTCTCAACTGAAACCGG
TACCTCCGCTTTTCGGTATCAACCAACCCACTTCCAAATGACACCTACGGTATCTC
CCAAGTCTGTGGGGTTCATTGGTTTCA (Sequence ID No. 10).

Далі, із вектора pPIC9K (Invitrogen) за допомогою стандартного метода рестрикції, див. [Sambrook et al.] був виділений ген стійкості до канаміцину і його промотор і клонований у сайт в 5,5 kbp, із якого був видалений вищезазначений фрагмент. Ген pPIC9K (Invitrogen) стійкості до канаміцину і його промотор були вставлені так, що вставлена ділянка мала таку послідовність:

GTACAACCTTGAGCAAGTGTGTCATGAGCTCCTCAAAATGGTCTCTGTAACGGATGA
CTCAACTTGACATTAACCTGAAGCTCAGTCGATTGAGTGAACCTTGATCAGGTGTG
CAGCTGGTCAGCAGCATAGGGAACACGGCTTTTCTACCAAACTCAAGGAATTATC
AACTCTGCAACACTTGCATGTCAGGTAGCAAGGAAATGTCATCTTGAAGTCGG
ACAGTGAGTGTAGTCTTGAGAAATCTGAAGCCGATTTTATTATCATGTCAGTCAGT
CATCAGGAGATCTCTACGCCGACGCATCGTGGCCGACCTGCAGGGGGGGGGG
GGGCGCTGAGGTCTGCTCTGTAAGAAGGTGTGCTGACTCATACAGGCCCTGAAT
CGCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGT
AGGTGGACAGTGTGATTTTGAACCTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCTGTGT
CGGGAAGATGCGTGATCTGATCTTCACTCAGCAAAAGTTTCGATTATTAACAAA
GCCGCGCTCCGCTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTACAAACCAATTAACCA
TTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAACTGCAATTTATCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTGAAGAACGCTTCTGTAATGAAGGAGAACTCACCGCA
GGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCA
ACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAAT
CACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTCC
AGACTTGTTCACAGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCA
AACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAA
AAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGCGCAGGAACACTGCCAGCGCA
TCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTTCTTAATACCTGGAATGCTGTTTCC
CGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTG
ATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTAGTCTGACCATCTCATCTGTA
ACATCATTTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAAGAAACACTTGGCCATCGGGC
TTCCATCAATCATGATGATTGTCGACCTGATTGCCGACATTTCCGAGCCAT
TTATACCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTAATCGCGGCTCGAGCAAGAC
GTTTCCCGTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGATTACTGTTATGTAAGCAGACA
GTTTATTGTTATGATGATATTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGA
GACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCTGCAGGTGGCATCACCGGCCACAC
GTGCGGTTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCG
CCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTG
GCCGGGGGACTGTTGGGCGCATCTCTTGCATG (Sequence ID No.9).

Отримана в результаті конструкція містила ген

стійкості G418, оточений приблизно 5 kbp рdc-ділянки, як показано на Фіг.6С. Була приготована подібна конструкція ДНК, яка містила внутрішній ген G418, оточений 2,3 kbp PDC1 *K. marxianus* у векторі pCR11, як показано на Фіг.6D.

Приклад 7. Використання лінійного фрагмента ДНК для розірвання ендогенної PDC кодувальної послідовності й одночасної інсерції LDH кодувальної послідовності

Описаний в Прикладі 5 лінійний фрагмент ДНК, створений за методом PCR, використовували у трансформуванні *K. marxianus*, *Yamadazuma stipitis* і *Hansenula polymorpha*. У трансформуванні використовувався протокол, описаний в публікації [Wesolowski-Louvel et al., Nonconventional yeasts in Biotechnology: *Kluyveromyces lactis*, ed. Klaus Wolf, Springer verlag, Berlin, p.138-201 (1996)]. Коротко, методика полягала в тому, що 5мл вирощуваної протягом ночі культури після центрифуги промили електропораційним буфером (10нМ Tris-HCl, 270нМ сахарози, 1нМ MgCl₂, рН 7,5). Промиті клітини піддали інкубуванню протягом 30 хвилин при 30°C в інкубаційному буфері (дріжджовий екстракт 5г/л, лептонний бульйон 10г/л, глюкоза 10г/л, 25нМ DTT, 20нМ NEPES, рН 8,0). По закінченні інкубування клітини знову промили і ресуспендували в 4мкл інкубаційного буферу. До цих клітин додали 20нг ДНК, і клітини піддали імпульсній обробці на приладі Bio-Rad Gene Pulser у режимі 1800 вольт, 1000Ом, 25мкФ у 0,4см кюветі.

Клітини висіяли на звичайні YPD (дріжджовий екстракт 10г/л, лептонний бульйон 20г/л, глюкоза 20г/л, агар 15%) планшети, і колонії залишили на регенерацію протягом 72 годин. Кожний із цих планшетів з колоніями реплікували на свіжих YPD-паншетах та інкубували протягом 48 годин. Далі колонії покрили шаром 6,5% м'якого агару (0,5% агар у 300мМ Tris-HCl, 187мМ глютамат, рН 8,3). До покритих планшетів додали суміш для забарвлення (3,2мл 1% агару, 1,6мл 120мМ Tris, 75мМ глютамат, рН 8,3, 0,4мл 2мг/мл феназинметосульфату, 7 одиниць глютаматпіруваттрансамінази і 7 одиниць L(+)-лактатдегідрогенази із м'яза свині). Дріжджі забарвлювалися у блакитні вінця високої L(+)-форми протягом 10-120 хвилин. Цей метод є подібним методу, запропонованому в роботі [Subden et al., Canadian J. Microbiol., 28:883-886 (1982)] і модифікованому Бітом [Witte et al., (J. Basic Microbiol. 29:707-716 (1989)]. Колонії відібрали, а відокремлені від колоній ДНК піддали PCR-аналізу і секвенували для виявлення розірваних піруватдекарбоксилазних генів.

В іншому варіанті здійснення клони, описані в Прикладі 6 і показані на Фіг.6с і 6d, піддали травленню двома ферментами рестрикції [Sambrook et al.], отримавши приблизно 3мкг фрагментної ДНК, що містила гомологічну PDC-ділянку, усередину послідовності якої був уставлений ген стійкості до канаміцину. Цим фрагментом за відомими методами, наприклад електропорації, трансформували *K. marxianus* з розірванням його рdc.

У загальному випадку електропорацію здійснювали таким чином: а) вирощували культуру мікроорганізму в YPAD протягом ночі (приблизно 15 годин) в об'ємі 20мл; б) переносили 500мкл цієї культури до мікродісцентрової пробірки, піддавали

її центрифугуванню @4К, 4 хвилини, видаляли супернатант; с) планшет промивали 1мл холодним EB (EB = електропораційний буфер: 10мМ Tris-HCl, рН 7,5; 270мМ сахароза; 1мМ MgCl₂); d) ресуспендували в 1мл IB (IB = інкубаційний буфер: YPD; 25мМ DTT; 20мМ Hepes, рН 8,0); е) струшували (@ 800об/хв, 30°C протягом 30 хвилин на приладі Eppendorf Thermomixer; f) піддали центрифугуванню, промивали один раз EB, ресуспендували в 400мкл EB; g) додавали 3мкг фрагментної ДНК (у воді 10мМ Tris-Cl, рН 8,5), інкубували на льоду протягом 30 хвилин; h) переносили в 0,4см електропораційну кювету; режим імпульсної обробки на приладі Bio-Rad Gene Pulser: 1000В, 1000Ом, 50мкФ; стала часу після імпульсу: приблизно 20мс; i) переносили до 3мл пробірки Мортон-Клозюра (Morton Closure), інкубували без струшування при 30°C протягом 1 години; додавали 400мкл рідкого YPAD-середовища (YPAD: 10г дріжджового екстракту, 20г пептону, 20г глюкози, 100мг аденінгемісульфату, об'єм 1л, без регулювання рН), струшували @ 800об/хв, 30°C протягом 1 години в приладі Eppendorf Thermomixer; додавали 400мкл рідкого YPAD і регенерували протягом 4-6 годин; j) піддавали центрифугуванню у мікродісцентровій пробірці @ 4К, 4 хвилини, видаляли супернатант, ресуспендували в 400мкл 1М сорбітолу; k) висівали на 200мкг/мл C418-селективні планшети; і l) інкубували при 30°C протягом 3-5 днів.

Колонії піддавали скринінгу спочатку другою корекцією покриття на 300мкг/мл G418. Геномну ДНК відокремлювали від вторинного дріжджового пetchу за стандартною методикою геномного препакування [Sambrook]. Далі їх піддавали PCR-скринінгу на 1) наявність фрагмента канаміцину, використовуючи підходящі праймери й умови [Sambrook], і 2) відсутність розірваної рdc-ділянки, використовуючи підходящі праймери і PCR-умови. Колонії, які були-позитивні по маркеру селекції і негативні по ділянці розриву рdc, піддавали культивуванню і аналізували за допомогою HPLC на фізіологію. Геномну ДНК із цих штамів аналізували за методом Саузерн-гібридизації.

Приклад 8. Характеристики росту клітин

1. Низький рН і висока температура

Вирощувані протягом ночі культури *K. marxianus* були інокульовані в 50мл дріжджового мінімального середовища згідно з [Kiers et al., Yeast, 14(5):459-469 (1998)]. У якості джерела вуглецю використовували 100г/л глюкози. Вирощувані протягом ночі культури витримувались при 40°C і були інокульовані в середовище, яке також витримувалося при 40°C. Додавання інокулянту привело до зміни рН середовища від 5,5 до 2,5. Протягом експерименту рН залишався на рівні 2,5. Концентрацію глюкози вимірювали за допомогою YSI-мембрани, а оптичну густину (OD: optical density) - за допомогою спектрофотометра.

Глюкоза була використана протягом 72 годин, засвідчуючи те, що метаболічна активність протягом цього часу культивування виникає в умовах низького рН і високої температури (Фіг.7). Крім того, в період між 48 і 72 годинами біомаса трохи зменшилася, вказуючи на те, що катаболізм клітин випереджав анаболізм (Фіг.7).

2. Пентозні джерела вуглецю

Вирощувані протягом ночі культури *K. marxianus* були інокульовані у три 50мл колби, що містили дріжджове мінімальне середовище згідно з [Kiers et al., Yeast, 14(5):459-469 (1998)]. В усіх трьох колбах містилися різні джерела вуглецю: в першій колбі містилася 10% глюкоза, в другій - 10% D-ксилоза, а в третій 10% L-арабіноза. Колби інкубувалися при 30°C за періодичних вимірювань оптичної густини.

Через 40 годин вихід біомаси дріжджових культур з глюкозою і ксилозою був однаковий, а у дріжджовій культурі з арабінозою - менший (Fig.8). Аналіз росту цих дріжджових культур виявив наявність у ньому початкового запізнення. Так, дріжджі, культивовані з арабінозою, мали початкове запізнення тривалістю в декілька годин, у той час як у дріжджів, культивованих з ксилозою воно виявилось значно більш виразним (Fig.8). Наявність такого запізнення свідчить про те, що дріжджові клітини потребують певного часу для адаптації до ксилонних і арабінозних вуглецевих джерел. Очевидно, цей час потребується для індукування синтезу поліпептидів, що за нормальних умов не експресуються.

3. Гідролізат маїсового волокна при низькому pH

Культивовані протягом ночі культури *K. marxianus* були інокульовані у колби, що містили дріжджове мінімальне середовище згідно з [Kiers et al., Yeast, 14(5):459-469 (1998)]. В усіх колбах у якості джерела вуглецю містився 30% гідролізат маїсового волокна. Гідролізат був приготований за допомогою реакції маїсового волокна з 1,2% сірчаною кислотою при температурі 145°C протягом 25 хвилин. Під час реакції геміцелюлоза розпадалася на мономерні продукти - арабінозу, ксилозу і глюкозу. Високотемпературні умови реакції викликали деструкцію деякої кількості арабінози і ксилози у фурфурал, а деякої кількості глюкози - у гідроксиметилфурфурал. HPLC аналіз гідролізату показав наявність у ньому 38,7г/л глюкози, 39,1г/л ксилози, 20,7г/л арабінози і 1,6г/л фурфуралу. Крім того, гідролізат мав pH 1,51. Перед культивуванням дріжджів pH гідролізату маїсового волокна був відрегульований на рівень 3,0. В процесі культивування періодично проводилися вимірювання оптичної густини.

Культивовані з гідролізатом маїсового волокна дріжджові клітини були здатні генерувати біомасу (Fig.9).

4. Варіювання pH

Вирощувані протягом ночі культури *K. marxianus* були інокульовані у чотири колби, кожна з яких містила 50мл дріжджового YPD-середовища (дріжджовий екстракт 10г/л, лептонний бульйон 20г/л, глюкоза 20г/л). Величини pH середовищ в усіх колбах були різними і регулювалися за допомогою HCl. У процесі культивування температура підтримувалася на рівні 30°C, і крім того періодично вимірювалася оптична густина. В кожній колбі спостерігався процес росту (Fig.10).

5. Куптурні середовища з молочною кислотою і різними pH

Вирощувані протягом ночі культури *K. marxianus* були інокульовані у чотири колби, кожна

з яких містила 50мл дріжджового YPD-середовища (дріжджовий екстракт 10г/л, лептонний бульйон 20г/л, глюкоза 20г/л), а також 40г/л молочної кислоти. Додавання молочної кислоти зробило pH 2,8. Величину pH у трьох колбах відрегулювали до зазначеного рівня за допомогою NaOH. У процесі культивування температура підтримувалася на рівні 30°C, і періодично проводилися вимірювання оптичної густини. В кожній колбі спостерігався процес росту культур (Fig.11).

Приклад 9. Реконбінантні клітини, здатні продукувати акрилл-СоА

Організм (наприклад, *E. coli*), не спроможний використовувати акрилат у якості джерела вуглецю, трансформували бібліотекою геномних ДНК *Clostridium propionicum*. Геномну бібліотеку *C. propionicum* створили за допомогою плазмиди pHES так, що вона експресувала 10 kbp фрагменти геному *C. propionicum*. Трансформовану *E. coli* висівали на селективне середовище, яке в якості джерела вуглецю містило лише акрилову кислоту. Росли при цьому лише ті клітини, які були спроможні асимілювати акрилат. Акрилат, зазвичай, асимілюється шляхом ферментопосередкованої конверсії його на лактат. Лактат, у свою чергу, може конвертуватися на піруват і використовуватися клітинами в циклі Кребса.

У разі вибору трансформованих *E. coli* із геномної бібліотеки виділяли плазмиду ДНК, і вставлений фрагмент піддавали секвенуванню. Секвенований фрагмент сканували по відкритих рамках зчитування для визначення кодувальної послідовності для ферментів, залучених у конверсію між лактатом і акрилатом (наприклад, лактоїл-СоА-дегідрогеназою і СоА-трансферазами).

Виділені клони, що містили кодувальну послідовність для цих ферментів, вводили у дріжджові клітини, описані в Прикладі 6, які містили лактат-дегідрогеназу і не мали піруватдекарбоксилазної активності. Реконбінантні дріжджові клітини, що містили уведено нуклеїнову кислоту, вибирали за допомогою G418 (300г/л). Після відокремлення реконбінантні дріжджові клітини вирощувалися в аеробних умовах на глюкозі з подальшим переключенням умов на анаеробні. Після цього живильний бульйон збирали і аналізували на акрилат за стандартною HPLC-методикою, як описано в [Danner et al., Biotechnological production of acrylic acid from biomass. In: Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol.70-72 (1998)].

Приклад 10. Реконбінантні клітини, здатні продукувати аскорбат Вектори експресії модифікували за допомогою генної інженерії таким чином, щоб експресувалися такі поліпептиди: 2,5-діоксвалератдегідрогеназа, 5-дегідро-4-деокси-D-глюкаратдегідратаза, глюкаратдегідратаза, альдегіддегідратаза, глюкоронлактонредуктаза і L-глюонолактонооксидаза. Нуклеїнокислотні послідовності, що кодують ці поліпептиди, виділяли із різноманітних мікроорганізмів. Модифіковані вектори експресії трансформували в дріжджові клітини шляхом електропорації. Трансформовані дріжджові клітини аналізували для визначення того, чи продукують вони L-аскорбат.

Приклад 11. Реконбінантні клітини, здатні виробляти D-ксилозу

Вектори експресії за допомогою методів генної інженерії модифікували таким чином, щоб експресувалися такі поліпептиди: 2-дегідро-3-деокси-D-пентаноатальдолаза, ксилонатдегідратаза, ксилонлактоназа і D-ксилозодегідрогеназа. Нуклеїно-кислотні послідовності, що кодують ці поліпептиди, виділяли із *Pseudomonas* sp. Модифіковані вектори експресії трансформували в дріжджові клітини шляхом електропорації. Трансформовані дріжджові клітини аналізували для визначення того, чи продукують вони D-ксилозу або інші сполуки пентозного джерела вуглецю.

Приклад 12. Рекомбінантні клітини, здатні виробляти цитрат На основі нуклеїно-кислотної послідовності аконітази *S. cerevisiae* (AcO1, номер доступу M33131 в базі Genbank) були сконструйовані PCR-праймери. Ці праймери використовували для клонування нуклеїнової кислоти, що кодує аконітазу із *Kluveromyces*, *Yamadazyma* або *Hansenula*. Після секвенування були створені лінійні конструкції, як описано в Прикладі 5, які були використані для дезінтегрування нуклеїнової кислоти, що кодує аконітазу, в дріжджових клітинах. У якості маркера селекції використовувався антибіотик G418 замість продукування лактату, як описано в Прикладі 5. В якості нуклеїнової кислоти, що забезпечувала стійкість до антибіотика G418, служив неомициновий/канаміциновий ген. Цей ген одержували із вектора pPIC9K (Invitrogen) і вставляли у вектор pHES. Дріжджові клітини трансформували PCR-генерованими лінійними фрагментами, модифікованими так, щоб мати кінці, гомологічні AcO1, як описано вище. Був сконструйований лінійний фрагмент для кодування гена стійкості до G418. Стейкими до антибіотика були лише ті клітини, які мали інтегрований лінійний фрагмент у місці знаходження нуклеїнової кислоти, що кодує аконітазу. Ці клітини аналізували на підходжу інтеграцію за допомогою PCR. Дріжджові клітини, одержані у цей спосіб, мали частково функціональний ТСА-цикл і, таким чином, могли виробляти цитрат у надлишковій кількості. Цей цитрат переносився крізь мітохондріальну мембрану в живильний бульйон. Крім того, ці дріжджові клітини були наділені екзогенною молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує такий фермент, як АТФ-цитратліаза таким чином, що вони каталізували конверсію акумульованого цитрату на оксалоацетат (див. Приклад 13).

Приклад 13. Рекомбінантні клітини, здатні експресувати цитратліазу в цитозолі

Дріжджові клітини позитивного фенотипу дикої яблуні трансформували плазмідом pHES з нуклеїно-кислотною послідовністю, що кодує поліпептид з АТФ-цитратліазною активністю. Цю нуклеїнову кислоту виділяють із *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (номер доступу X79817 в базі Genbank) або інших опублікованих джерел. Трансформовані дріжджові клітини аналізували на їх здатність використовувати цукри для вироблення великих кількостей ліпідних накопичень. Дріжджові клітини також аналізували на предмет того, чи виявляли вони АТФ-цитратліазну активність, як описано в [Holdsworth et al., J. Gen. Microbiol., 134:2907-2915 (1998)]. Дріжджові клітини, що мають АТФ-цитратліазну активність, здатні постачати цитозольний ацетат в ае-

робних умовах без розкладання альдегіду на ацетат альдегіддегідрогеназою. Крім того, якщо такі дріжджові клітини не мають піруватдекарбоксилазної або альдегіддегідрогеназної активності, вони повинні постачати ацетат для біосинтезу шляхом циклу Кребса.

Приклад 14. Рекомбінантні клітини, які не можуть використовувати лактат у якості джерела вуглецю

Дріжджові клітини модифікували таким чином, щоб знизити активність транспортера карбонової кислоти, подібного до поліпептиду JEN 1 *S. cerevisiae*. Такі дріжджові клітини мають знижену здатність переносити лактат, а отже використовують його з меншою ефективністю. Активність транспортера карбонової кислоти в дріжджових клітинах знижували шляхом дезінтегрування локусу, що містить кодувальну послідовність для цього поліпептиду. По-перше, використовуючи дегенеративні праймери, сконструйовані на основі доступної послідовності для JEN 1 (номер доступу U24155 в базі Genbank), із клітини-хазяїна виділили гомолог поліпептиду JEN 1. Виділену із клітини-хазяїна нуклеїнову кислоту піддали секвенуванню. Дезінтегрування кодувальної послідовності для цього поліпептиду здійснювали за методикою, описаною в Прикладі 11. Лінійні фрагменти генерували шляхом кодування ділянок, гомологічних послідовності JEN 1, а також усього гена стійкості до G418. Такий лінійний фрагмент інтегрували у геномну послідовність JEN 1, викликаючи дезінтегрування даної активності. Клітини, які не мали активності транспортера карбонової кислоти, ідентифікували за їхньою нездатністю переносити карбонову кислоту, а отже за їхньою нездатністю рости при культивуванні на лактаті.

Крім того, клітини модифікували таким чином, щоб знизити активність функціонального еквівалента цитохромного поліпептиду b2 *S. cerevisiae*. Цитохромний поліпептид b2 дає можливість клітинам *S. cerevisiae* надавати метаболічному перетворенню лактат в мітохондріях. Для цього передусім сконструювали дегенеративні праймери із цитохромної послідовності b2 *Saccharomyces* (номер доступу Z46729 в базі Genbank). Ізольований клон піддали секвенуванню. За допомогою методів, описаних в [Eds. Alison et al., in «Methods in Yeast Genetics», Cold Spring Harbor Press (1997)], проводили дезінтегрування дріжджового хазяїна, гомологічного цитохрому b2. Ця рекомбінантна дріжджова клітина є нездатною використовувати лактат у якості джерела вуглецю.

Приклад 15. Вироблення лактату у великих кількостях

Були приготувані і вироблені численні варіанти клітин *K. marxianus* зі зниженою PDC-активністю. Ці варіанти модифікували таким чином, щоб вони містили різні кількості копій екзогенної молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид з LDH-активністю. LDH-поліпептид одержували із різноманітних джерел. Клітини таких варіантів можуть мати різні питомі продуктивності для молочної кислоти при 40°C.

Усі варіанти вирощувалися в посудині в аеробних умовах з потоком повітря 1,5 WM і 30% вмістом розчиненого кисню для одержання клітинної

густини приблизно 60г/л сухої маси. По досягненні достатньої густини постачання повітря припиняли, і умови в культивативній посудині переключалися на анаеробні. Основу не добавляли. Варіанти з найвищою питомою продуктивністю в анаеробній фазі можуть бути виявлені не тільки за здатністю більш швидкого вироблення молочної кислоти, але також за здатністю досягати більш високої концентрації за нижчої рН, ніж варіанти з нижчою питомою продуктивністю. Вихід продукту на глюкозі у фазі вироблення продукту може перевищувати 90%.

Було вибрано декілька варіантів, які культивувалися у ті самі способи, за винятком того, що потік повітря був знижений до 0,1 WM, але не виключений повністю. За цих умов кінцевий рН в культивативній посудині може бути нижчим, а концентрація лактату може бути вищою, ніж при культивуванні без доступу повітря. Вихід продукту на глюкозі може знижуватися, але залишатися на рівні приблизно 90%. У повторному експерименті, де потік повітря був збільшений до 0,5 WM, вихід продукту на глюкозі знизився до рівня менше 80%.

Приклад 16. Вироблення великих кількостей лактату з серією послідовних ферментацій

У процесі з серією послідовних ферментацій у якості інокуляту використовували культуру клітин *K. marxianus*, які не мали PDC-активності, але мали LDH-активність. Кожну стадію ферментації здійснювали у поступово збільшуваних посудинах, кожну з яких стерилізували безпосередньо перед використанням. Крім того, у кожну посудину подавали потік повітря 1,5 WM, а їхній вміст перемішували для підтримання в ньому постійної концентрації розчиненого кисню на рівні вище 10%. Остання посудина мала ємність 6000л. Температуру в посудинах підтримували на рівні 45°C для збільшення виживаності генетично модифікованих клітин *K. marxianus* порівняно з дріжджами дикого типу та іншими мікроорганізмами. Кожну посудину управляли стандартним культурним середовищем, розрахованим на оптимальне вирощування.

Вміст останньої посудини з густиною клітин 100г клітин/л (сухої маси) переносили до обробленого перед тим паром реактора ємністю 30000л. Для добавлення найкраще використовувати клітини, одержані від фільтрації у попередніх виробничих процесах. Густина клітин в реакторі складала 6 г клітин на літр (сухої маси). Глюкозу добавляли до рівня 80г/л. В посудині підтримували анаеробні умови з температурою 42°C і періодом вирощування 25 годин. Питома продуктивність складала більше 0,5г лактату/(грам біомаси за годину) майже до кінця процесу, коли продуктивність починала падати. Як тільки продуктивність починала падати, клітини видаляли і зберігали для повторного використання. Кінцева концентрація лактату складала 75г/л, а рН дорівнював 2,8. Після видалення біомаси розчин концентрували шляхом випаровування до 50% концентрації лактату. Вільну кислоту (близько 86% від загального лактату) видаляли шляхом рідинного екстрагування в органічне середовище, звідки її знову екстрагували за більш високої температури у воду. Рафінад, який містив сіль лактату, очищали і спрямовували для повторного використання в якості буферу в культивативну

посудину, або підкислювали, наприклад, сірчаною кислотою й очищували.

Приклад 17. Порівняння аеробного вироблення організмів негативного (*K. marxianus*) і позитивного (*S. uvarum*) фенотипів дикої яблуні

Організми негативного (*K. marxianus*) і позитивного (*S. uvarum*) фенотипів дикої яблуні вирощували кожний в аеробному й анаеробному ферментаційних реакторах періодичної дії. Культивування продукту по партіях здійснювали при температурі 30°C в лабораторних ферментаторах робочим об'ємом 1,5л. Величину рН в посудинах підтримували на рівні $5,0 \pm 0,1$ шляхом автоматичного добавлення 2М/л⁻¹ гідроксиду калію (KOH). Ферментатор обдували повітрям (аеробні культури) або азотом (анаеробні культури) з витратою газу 0,8л/хв.⁻¹ і перемішували зі швидкістю 800об/хв. Концентрацію розчиненого кисню постійно контролювали за допомогою кисневого електроду (фірма Ingold, тип 34 100 3002). В аеробних культурах концентрація розчиненого кисню підтримувалася на рівні вище 60%. Через відповідні інтервали часу відбирали 10мл зразки для визначення сухої маси і концентрацій метаболітів. У якості сполук, потрібних для синтезу жирних кислот, в анаеробні культури добавляли Tween-80 і ергостерол.

У період експоненційного росту як суха маса і оптична густина OD660 дріжджових культур, так і концентрація глюкози й етанолу в супернатанті визначалися з відповідними інтервалами часу. Питому продуктивність вироблення етанолу (q_{ethanol} , ммоль/г/година) обчислювали за такою формулою, використовуючи лінійно-регресійний аналіз:

$$q_{\text{ethanol}} = \frac{dE}{dC_x} \cdot \mu_{\text{max}}$$

де dE/dt (швидкість зростання концентрації етанолу в культурі, ммоль/л/година) і dC_x/dt (швидкість зростання концентрації біомаси, г/л/година) обчислювалися шляхом диференціювання графіків концентрації етанолу і концентрації біомаси в залежності від часу μ_{max} /година. Максимальна питома продуктивність на глюкозі оцінювалася по експоненційній частині графіку залежності C_x від часу. Для обчислення питомої швидкості споживання глюкози (q_{glucose} , ммоль/г/година) dE замінювали на dG (кількість глюкози, спожитої за годину).

В аеробних партіях культур питома швидкість росту штамів *Kluveromyces* і *Saccharomyces* на глюкозі складала відповідно 0,4/год. і 0,28/год. Висока концентрація глюкози і зумовлена цим висока питома швидкість росту культури *Saccharomyces* давали високі швидкості аеробної спиртової ферментації (Табл.3, Фіг.1). Питома швидкість споживання глюкози штамом *Saccharomyces* була приблизно в 2 рази вищою, ніж у штаму *Kluveromyces* внаслідок інтенсивної спиртової ферментації. З точки зору енергетики спиртова ферментація є для клітин менш ефективним шляхом генерування АТФ. Вихід біомаси на глюкозі у *Kluveromyces* складав 0,38г/г, а у *Saccharomyces uvarum* 0,14г/г. Вихід етанолу на глюкозі був нульовим у штаму *Kluveromyces* нега-

тивного фенотипу дикої яблуні і складав 1,83ммоль/ммоль у *Saccharomycetes* - культурі по-

зитивного фенотипу дикої яблуні.

Таблиця 3

Максимальна питома швидкість росту, питомі швидкості вироблення етанолу і споживання глюкози (q , ммоль/г біомаси/година), вихід біомаси (г/г), вихід продукту (ммоль/ммоль) і регенерування вуглецю (%) (обчислене тільки для анаеробних культур) на стадії експоненційного росту в партіях культур *Saccharomycetes uvarum* і *Kluuveromycetes marxianus* на мінеральному середовищі з умістом глюкози 2% (маса/об'єм)

	K. marxianus		S. uvarum	
	аеробні	анаеробні	аеробні	анаеробні
μ_{max} /год	0,38	0,09	0,28	0,12
$q_{glucose}$	5,8	7,6	10,9	7,2
$q_{ethanol}$	0	9,9	20	9,7
$Y_{p/s}$	0	1,30	1,83	1,35
$Y_{x/s}$	0,38	0,07	0,14	0,09
Регенер. C	-	84,6	-	73,3

В анаеробних партіях культур питома швидкість росту і вихід біомаси в обох штаммах були дуже низькими порівняно з тими, що спостерігалися в аеробних умовах (Табл.3, Фіг.1 і 2). У штамів *Kluuveromycetes* і *Saccharomycetes* вихід біомаси складав відповідно 0,07 і 0,09г/г. Обидва штами показали високу питому швидкість спиртової ферментації в анаеробних умовах. Це було підтверджене даними вироблення CO_2 .

Таким чином, даний Приклад свідчить про те, що аеробне вироблення біомаси є значно більш швидким, ніж анаеробне, і що вихід біомаси за аеробних умов культивування є вищим в організмів негативного фенотипу дикої яблуні (оскільки в організмів позитивного фенотипу має місце деяка спиртова ферментація при використанні глюкози). Цей Приклад також показує, що продукт ферментації (у даному випадку - етанол) виробляється з однаковою швидкістю обома організмами - негативного і позитивного фенотипів дикої яблуні - в анаеробних умовах. Таким чином, анаеробна стадія росту забезпечує високий вихід біомаси, а наступна за нею анаеробна стадія ферментації постачає метаболічну енергію в процес створення

продукту, а не в процес росту культури. Отже процес, в якому вироблення продукту відділене від росту культури, забезпечує більшу технологічну гнучкість і кращий контроль виходу продукції.

Приклад 18. Поліпшене вироблення лактату в штамі-хазяїні, який в природних умовах виробляє L-молочну кислоту: ампліфікація лінійних фрагментів гомологічної ДНК для дезінтегрування піруватдекарбоксилазних генів

Дріжджі *Kluuveromycetes thermotolerans* (K. thermotolerans) є природним виробником L-молочної кислоти [Kurtzman and Fell, (1998) "The Yeasts, A Taxonomic Study" pp.240-241; Elsevier Science B.V.; Amsterdam, The Netherlands]. K. thermotolerans мають створюваний природним шляхом лактатдегідрогеназний (ldh) ген, котрий дозволяє виробляти L-молочну кислоту. Кількість молочної кислоти, вироблюваної за анаеробних умов, складає приблизно 4% г/г використаної глюкози, у той час як решта глюкози, головним чином, конвертується в етанол (42,5% г/г спожитої глюкози), гліцерол (3% г/г спожитої глюкози) і ацетат (0,3% г/г спожитої глюкози).

Таблиця 4

Результати анаеробної ферментації при використанні K. thermotolerans, починаючи з 100г/л глюкози в середовищах YPAD (збагачені середовища)

Час	Глюкоза	Молочна	Ацетат	Гліцерол	Етанол	Молочна YSI
0	92,937	0	0	0	0,025	0,06
12	79,603	0,476	0	0,41	3,345	0,6
36	38,618	2,135	0	2,011	25,642	2,08
54	11,662	3,525	0,2	2,789	41,522	3,34
78	1,539	4,322	0,209	3,213	42,5	3,88
98	0,286	4,365	0,307	3,24	42,5	3,74

За допомогою консенсусних праймерів, сконструйованих із послідовності, виведеної шляхом порівняння генних послідовностей із K. marxianus і K. lactis була виділена 600 bp ділянка PDC1 із K. thermotolerans. Фрагмент PDC1 був підданий секвенуванню [Sanger] і використаний для виділення

7,5 kbp фрагмента навколо pdd K. thermotolerans (Фіг.6Е) за допомогою методів PCR і геномної «прогулянки» (Clonotech). Далі 7,5 kbp фрагмент був клонований у вектор клонування pCRII набору TA (Invitrogen). Частина довжиною приблизно 730 bp поблизу середини кодувальної ділянки PDC1

була видалена із 7,5 kbp фрагмента *K. thermotolerans*. Частина *pdcl* *K. thermotolerans*, видалена шляхом рестрикційного травлення [Sambrook], містила таку послідовність:

```
TTACCACTGTCTTCGGTCTGCCAGGTGACTTCAATCTGCGTCTGTTGGACGAGATCT
ACGAGGTGCGAGGGTATGAGATGGGCGGTAACGTGAACGAGTTGAACGCTTCTTAC
GCTGCCGACGCTTACGCCAGAATCAAGGGTATGCTGTTGATCACCACCTTCGG
TGTCGGTGAGTTGTCCGCTTTGAACGGTATCGCCGGTCTTACGCTGAGCAGCTCG
GTGCTTGCACATTGTGCGGTGCCATCCGCTCCGCCAGGCCAAGCAGCTATTG
TTGCACCACACCTTGGGTAACGGTGACTTCACTGTCTTCCACAGAATGTCGCCAAC
ATCTCTGAGACCACTGCTATGATCACTGATCTAGCTACCGCCCATCTGAGATCGAC
AGATGATCAGAACCACTACATTAAGACAGAGACCTGTCTACTTGGGTTTGCCATCT
AACTTCGTTGACCAAGTGTCCAGCCTCTCTATTGGACACCCCAATTGACTTGGCC
TTGAAGCCAAACGACCCAGCAGGCTGAGGAGGAGGTCATCTCTACTTTGTTGGAGAT
GATCAAGGACGCTAAGAACCAGTCATCTTGGCTGACGCTTGCCTTCCAGACACG
ATGTCAAGGCTGAGACCAAGAAGTTGATTGACATCACTCAGTTCCTCATCTTCGTTA
CCCCAATGGGTAAAGGTTTCATTGACGAGAACCCCAAGATTGCGTGGTGTCTAC
GTCGGTACCTTGT (Sequence ID No. XX).
```

Далі, перетравленнями рестрикції із вектора pPIC9K (Invitrogen) був виділений ген, що кодує стійкість до канаміцину, включаючи його промотор. Ген був клонований у сайт в 7,5 kbp, із якого був видалений 730 bp фрагмент. Ген стійкості до канаміцину і його промотор із pPIC9K (Invitrogen) мав таку послідовність:

```
GTACAACCTTGAGCAAGTTGTGCGATCAGCTCCTCAAAATTGGTCTCTGTAACGGATGA
CTCAACTTGCACATTAACCTTGAAGCTCAGTCGATTGAGTGAACCTGATCAGGTTGTG
CAGCTGGTCAGCAGCATAGGGAACACGGCTTTCTACCAAACTCAAGGAATTATC
AACTCTGCAACACTTGCCTATGACAGGAGCAAGGAAATGTCTACTTTGAAGTCGGA
CAGTGAGTGTAGTCTTGAGAAATCTGAAGCCGATTTTTATTATCAGTGAGTCAGTC
ATCAGGAGATCCTCTACGCCGGACGATCGTGGCCGACCTGCAGGGGGGGGGGG
GGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACAGGCTGAATC
GCCCATCATCAGCCAGAAAGTGAGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTA
GGTGGACCACTTGGTATTGTAATTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTG
GGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTGATTTATCAACAAAG
CCGCCGTCCTCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTACAACCAATTAACCAAT
TCTGATTAGAAAACCTCATCGAGCATCAAACTGCAATTTATTCATATCAGGAT
TATCAATACCATATTTTGAAGAACCGTTTCTGTAATGAAGGAGAACTCAGCGAG
GCAGTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCGCGAATCCGATCGTCCAA
CATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATC
ACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCAATTTCTTCCA
GACTTGTTCACAGCGCAGCCATTACGCTCGTCATCAAACTCACTCGCATCAACCAA
ACCGTTATTCTATTCTGATTGCGCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAA
AGGACAATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCAT
CAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTCCC
GGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAATGCTTGA
TGGTCCGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTATGCTGACCATCTCATCTGTAA
CATCATTTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTGGCGCATCGGGCT
TCCCATACAATCGATAGATTGTCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATT
TATACCCATATAAATCAGCATCATGTTGGAATTTAATCGCGCCTCGAGCAAGACG
TTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTGTGATTACTGTTATGTAAGCAGACAG
TTTTATTGTTGATGATATATTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG
ACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCTGCAGTCTGGCATCACCGCGCCACAGG
TGCGGTTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGC
CACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGCTGG
CCGGGGGACTGTTGGCGCATCTCTTGCATG (Sequence ID No.9).
```

Кінцева конструкція включала у себе ген (G418) стійкості до канаміцину, оточений приблизно 6,8 kbp PDC-ділянкою, як показано на Фіг.6f.

Зображена на Фіг.6F конструкція була перетравлена двома ферментами рестрикції [Sambrook] з виходом приблизно 3 мікрограмів фрагмента

ДНК, що містив гомологічну PDC-ділянку і вставлений в середину послідовності ген стійкості до канаміцину. Для дезінтегрування PDC *K. thermotolerans*, остання була трансформована цим фрагментом за допомогою одного із відомих методів -електропорацією. Метод електропорації полягав у тому, що: а) в об'ємі 20мл протягом ночі (приблизно 15 годин) вирощували культуру в YPAD-середовищі; б) 500мкл культури перенесли до мікрівідцентрової пробірки, піддали центрифугуванню @4K, 4 хвилини, видалили супернатант; с) промили 1мл холодним EB (EB = електропораційний буфер: 10mM Tris-HCl, pH 7,5; 270mM сахароза; 1mM MgCl₂); d) ресуспендували в 1мл IB (IB=інкубаційний буфер: YPD; 25mM DTT; 20mM Hepes, pH 8,0); е) струшували @ 800об/хв, 30°C протягом 30 хвилин на приладі Eppendorf Thermomixer; f) піддали центрифугуванню, промивали один раз EB, ресуспендували в 400мкл EB; g) добавили 3мкг фрагментної ДНК (у воді 10mM Tris-HCl, pH 8,5), інкубували на льоду протягом 30 хвилин; h) перенесли до 0,4см електропораційну кювету; режим імпульсної обробки на приладі Bio-Rad Gene Pulser: 1000В, 1000Ом, 50мкФ; стала часу після імпульсу: приблизно 20мс; i) перенесли до 3мл пробірки Мортон-Клозюра (Morton Closure), інкубували без струшування при 30°C протягом 1 години; j) додали 400мкл рідкого YPAD-середовища (YPAD: 10г дріжджового екстракту, 20г пептону, 20г глюкози, 100мг аденінгемісульфату, об'єм 1л, без регулювання pH), струшували @ 800об/хв, 30°C протягом 1 години в термоміксері Eppendorf Thermomixer; k) додали 400мкл рідкого YPAD і регенерували протягом 4-6 годин; l) піддали центрифугуванню у мікрівідцентровій пробірці @ 4k, 4 хвилини, видалили супернатант, ресуспендували в 400мкл 1М сорбітолу і висіяли на 100мкг/мл 6418-селективні планшети; i m) інкубували при температурі 30°C протягом трьох-п'яти днів.

Колонії піддали скринінгу спочатку другим покриттям на культивувальний планшет, що містив 200мкг/л G418. Із вторинної дріжджової партії видалили геномну ДНК за допомогою стандартного методу геномного препарування [Sambrook]. Далі видалений геномний продукт піддали PCR-скринінгу на 1) наявність фрагмента канаміцину за допомогою відповідних праймерів і умов [Sambrook] і 2) відсутність дезінтегрованої PDC-ділянки за допомогою відповідних праймерів і умов PCR. Колонії, позитивні по маркеру селекції і негативні по ділянках дезінтегрування PDC, були піддані культивуванню для подальших обстежень, наприклад, геномних ДНК із цих штамів за допомогою Саузерн-гібридаційного аналізу.

Зрозуміло, що поданий вище докладний опис винаходу має на меті лише його ілюстрацію і жодною мірою не обмежує його об'єму, визначеного наведеною нижче Формулою винаходу, яка охоплює також інші його ознаки, переваги і модифікації.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Раджгархія, Вінт
Хатзіманікатіс, Васілій
Олсон, Стейсі
Карлсон, Тінг, Ліу
Старр, Джон, Н
Колстад, Джеффри, Дж.
Йал, Аарон

<120> Способи і матеріали для синтезу органічних продуктів

<130> 6786.169WO11

<140> PCT/US00/13907

<141> 2000-05-19

<150> 09/316,490

<151> 1999-05-21

<160> 11

<170> Патент у версії 2.1

<210> 1

<211> 92

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 1
cccaagcttg aattcccccgg gggatccctg cagggtacca cgcgtagatc tactagtgcg 60
gcccgcctcga gtctagaggg cccaagcttg gg 92

<210> 2

<211> 91

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 2
ccaagcttgg gccctctaga ctccgaagcgg ccgcactagt agatctacgc gtgtgaccct 60
gcagggatcc cccggggaat tcaagcttgg g 91

<210> 3

<211> 31

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 3
ccgggatcca tggcaagaga ggaacaccc c 31

<210> 4

<211> 32

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 4
ccaagatctt tattgacgaa ccttaacgcc ag 32

<210> 5

<211> 37

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 5
ccgggatcca tgtctaatat tcaaaatcat caaaaaag 37

<210> 6

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 6

ccaagatctt tatttgcctt gtttttcagc aag 33

<210> 7

<211> 82

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 7

taaacagtag aatcgcaag aaaagctcca caccacaacc aaataattgc aatgcaactt 60
ctttctcttt tttttcttt ct 82

<210> 8

<211> 79

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 8
ttataaaatc attaaaatcc aaaatcgtaa tttatctctt tatctctccc ctctctacat 60
gccggtagag gtgtggtca 79

<210> 9

<211> 1738

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Ген стійкості до канаміцину і промотор

<400> 9
gtacaacttg agcaagttgt cgtatcagtc ctcaaatgg tctctgttaa cggatgactc 60
aacttgaca ttaacttgaa gctcagtcga ttgagtgac ttgagtcagt tgtgcagctg 120
gtcagcaga tagggaaaca cggcttttcc taccacaact aaggaaattt caaatctgc 180
aacacttgcg tatgcaggtg gcaagggaat tgcatactt gaagtcggac agtgagtga 240
gtcttgagaa attctgaagc cgtattttta ttatcagtg gtcatctac agagatctct 300
ctacgcgga cgcactcgtg ccgactcgca gggggggggg gggcgctgag gtctgcctcg 360
tgaagaaggt gttgctgact cataccagcc ctgaatcgcc ccatcatcca gccagaaagt 420
gagggaagca cggttgatga gagctttgtt gtatgtggac cagttggtga ttttgaactt 480
ttgctttgcc acggaacggt ctgcgttgc ggaagatgc gtatctgat ccttcaactc 540
agcaaaagtt cgaattatc aacaagccg ccgtccctgc aagtcagcgt aatgctctgc 600
cagtggtaca accaatatc caattctgat tagaaaaat cctcgcagcat caaatgaac 660
tgcaatttat tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgta 720
gaaggagaa actcaccagc gcaattccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg 780
attcgcactc gtccaacatc aatacaacct attaatctc cctcgtcaaa aataagttat 840
tcaagtgaaga aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaattggcaa aagcttatgc 900
attctttccc agacttggtc aacagggcag ccattacgt cgtcatcaaa atcactcgca 960
tcaaccaaac cgttattcat tctgtattgc gctgagcga gacgaatac gcgatcgtg 1020
ttaaaaggac aattacaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaaac tgccagcgca 1080
tcaacaatat tttaacctga atcaggatat tcttcaata cctggaatgc tgttttcccg 1140
gggatcgagc tggtagttaa ccatgcatca tcaggagtag ggaataaat cttgatggtc 1200
ggaaggagca taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg 1260
gcaacgtac ctttgccatg ttccagaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat 1320
cgaatagatt tcgcacctga tgcgccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa 1380
tcagcatcca tgttggaatt taatccggc ctgcagcaag acgtttcccg tgaatatgg 1440
ctcataaac ccttgattt actgtttatg taagcagaca tttttattgt tcatgatg 1500
atatttttat cttgtgcaat gtaacatcag agattttgag acacaacgtg gctttcccc 1560
ccccccctgc aggtcgccat caccggcgcc acaggtgogg ttgctggcgc ctatatcgcc 1620
gacatcacg atgggggaag tcgggctcgc cacttcggcg tcatgagcgc ttgtttcgcg 1680
gtgggtatg tggcaggccc cgtggccggg ggaactgttg gcgccatctc ctgcatg 1738

<210> 10

<211> 372

<212> ДНК

<213> Kluyveromyces marxianus

<400> 10

ccggtctctt ctcttactct tacaagacca agaacttgt cgaattccac tccgactaca 60
tcaaggtcag aaacgccact ttcccaggtg tccaatgaa gttcgtcttg caaagttgt 120
tgaccaggt caaggtgct gctaggggtt acaagccagt tccagttctc cagctccaa 180
gagacaacaa gccagttgct gactctact cattgaagca agaattgggtc tggactcaag 240
tcggtagtt cctacaagaa ggtgtggtt ttctaactga aaccggtacc tccgctttcg 300
gtatcaacca aaccacttc ccaaatgaca cctacggtat ctcccaagtc ttgtggggtt 360
ccattgggtt ca 372

<210> 11

<211> 747

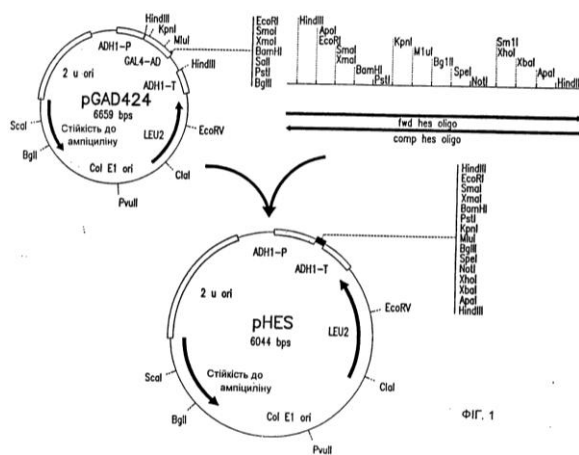
<212> ДНК

<213> Kluyveromyces thermotolerans

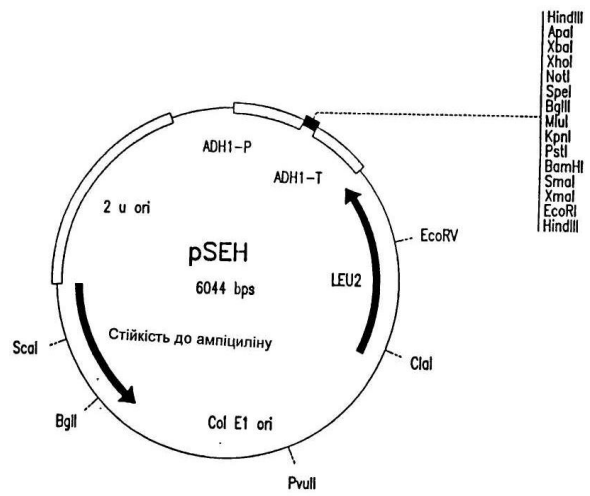
<400> 11

```

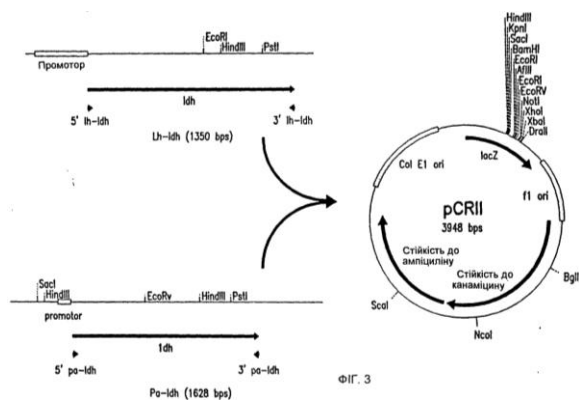
ttaccactgt cttcggtctg ccaggtagt tcaatctgcg tctgttgac gagatctacg 60
aggtcgaggg tatgagatgg gccggttaact gtaacgagtt gaacgcttct tacgctgccg 120
acgcttacgc cagaatcaag ggtatgtcct gtttgatcac caccctcggt gtcggtgagt 180
tgtccgcttt gaacggtatc gccggttctt acgctgagca cgctcggtgtc ttgcacattg 240
tcggtgtccc atccgtctcc gccaggcca agcagctatt gttgcaccac accttgggta 300
acggtgactt cactgtcttc cacagaatgt ccgccaacat ctctgagacc actgctatga 360
tactgatct agctaccgcc ccatctgaga tcgacagatg tatcagaacc acctacatta 420
gacagagacc tgtctacttg ggtttgccat ctaacttcgt tgaccagatg gtcccagcct 480
ctctattgga caccacaatt gacttggcct tgaagccaaa cgaccagcag gctgaggagg 540
aggtcacttc tactttgttg gagatgatca aggacgtaa gaaccagtc atcttggctg 600
acgcttgccg ttccagacac gatgtcaagg ctgagaccaa gaagttgatt gacatcactc 660
agttcccatc ttctgttacc ccaatgggta agggttccat tgacgagaag caccacaagt 720
tcggtggtgt ctacgtcggg accttgt 747
  
```



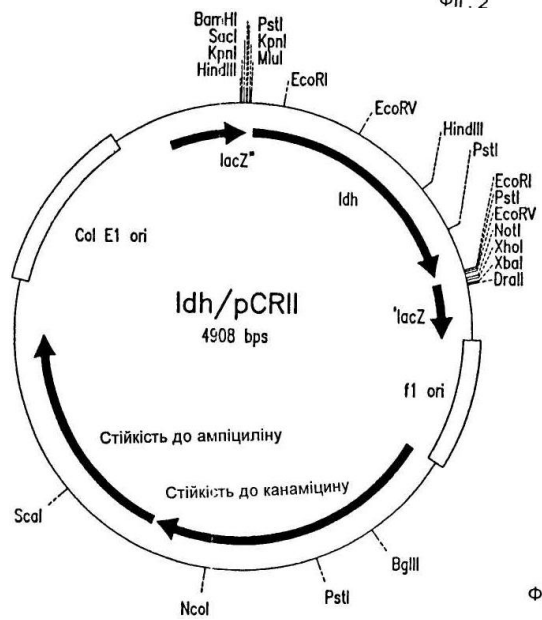
ФІГ. 1



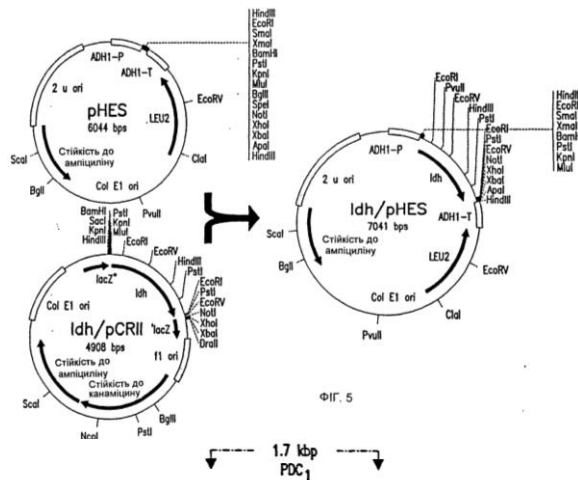
ФІГ. 2



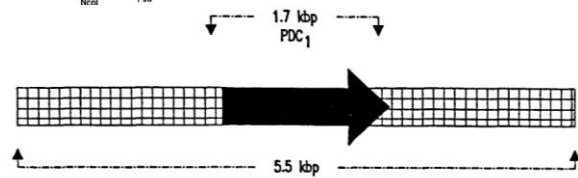
ФІГ. 3



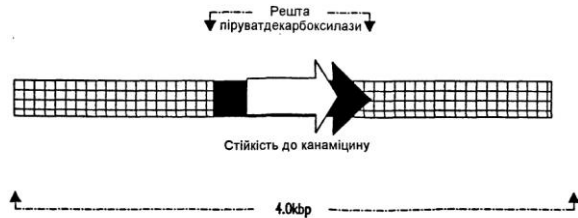
ФІГ. 4



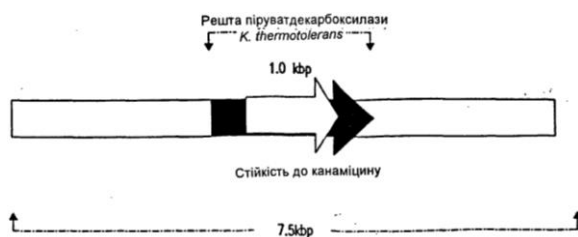
ФІГ. 5



ФІГ. 6B

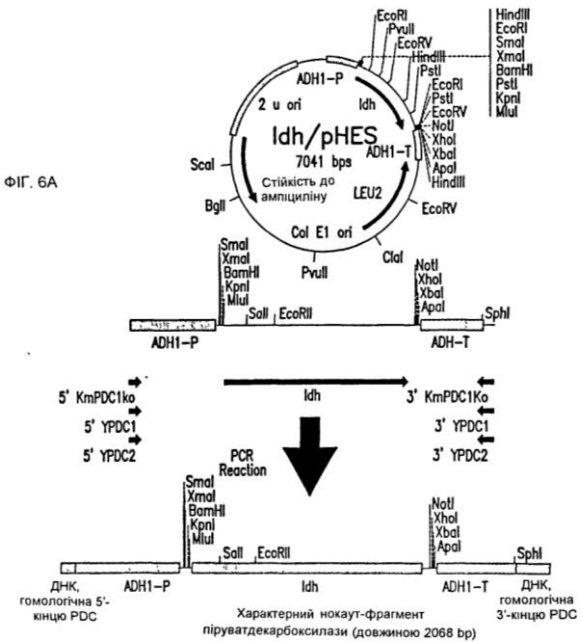


ФІГ. 6D

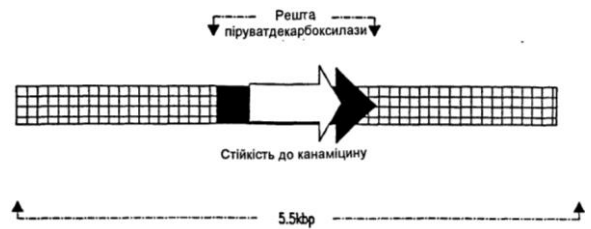
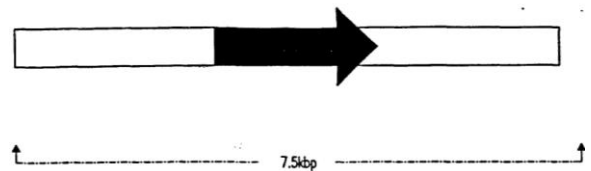


ФІГ. 6F

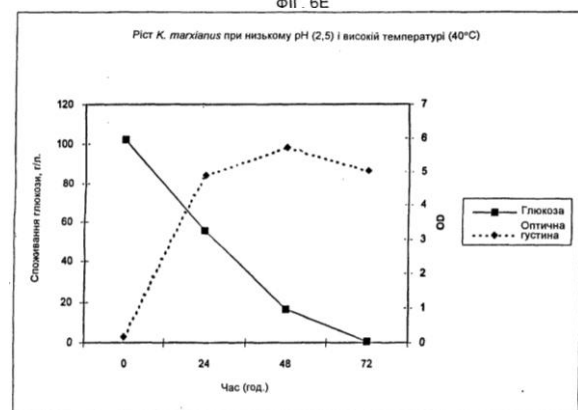
ФІГ. 6A



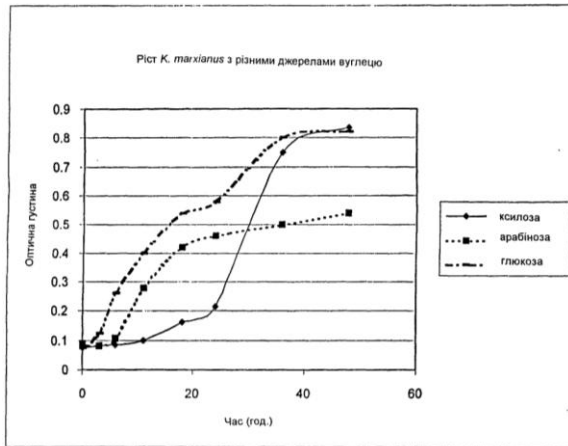
Характерний нокаут-фрагмент піруватдекарбоксилази (довжиною 2068 bp)

ФІГ. 6C
піруватдекарбоксилаза
K. thermotolerans
1.7 kbp

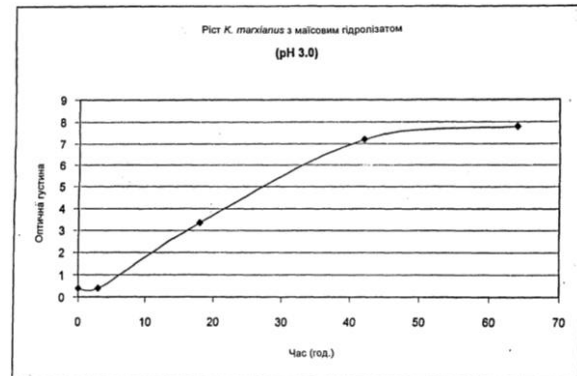
ФІГ. 6E



ФІГ. 7



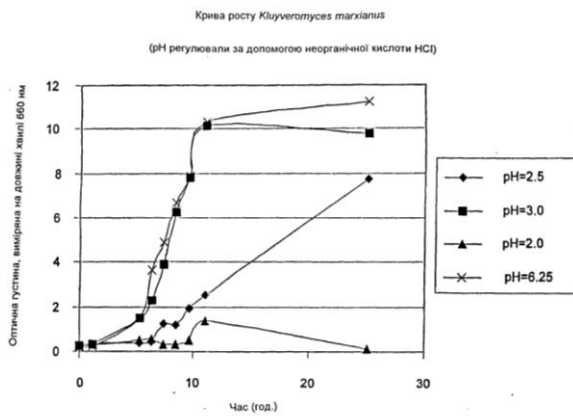
ФІГ. 8



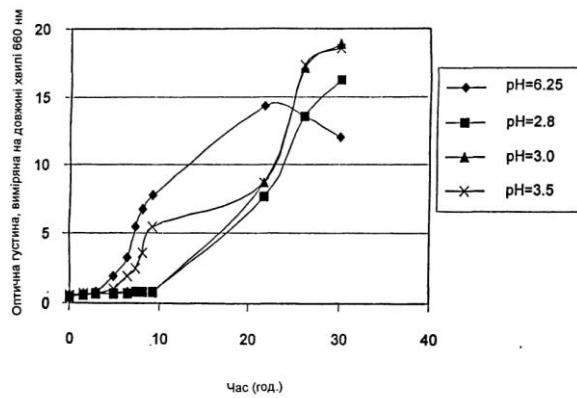
ФІГ. 9

Криві росту *K. marxianus*

при низьких pH і наявності 40 г/л молочної кислоти

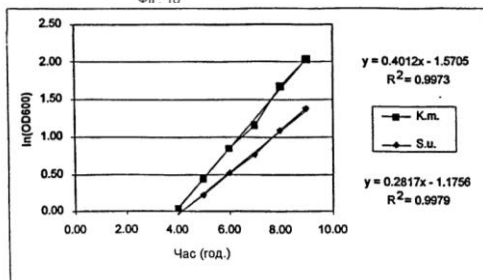


ФІГ. 10

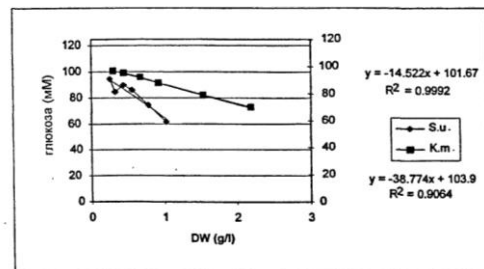


ФІГ. 11

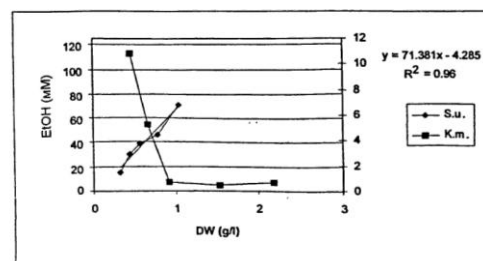
ФІГ. 12A



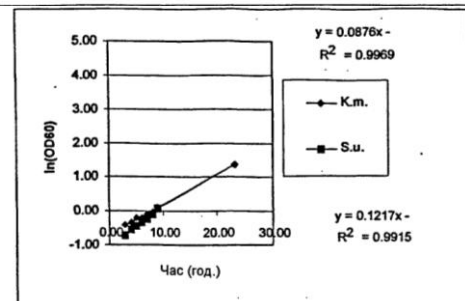
ФІГ. 12B



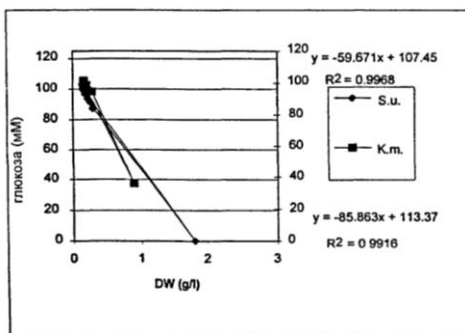
ФІГ. 12C



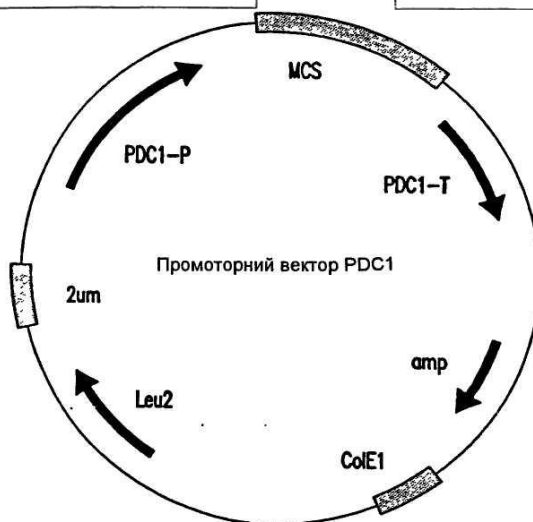
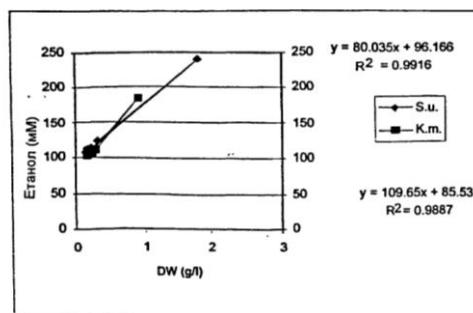
ФІГ. 13A



ФІГ. 13В



ФІГ. 13С



ФІГ. 14