



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **108853**

(13) **C2**

(51) МПК

**C12P 7/10** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

|  |                                      |  |  |
|--|--------------------------------------|--|--|
| <b>(21)</b> Номер заявки:  | <b>а 2012 01295</b>                  | <b>(72)</b> Винахідник(и):                                   | <b>Класен Пол (NL),</b>  |
| <b>(22)</b> Дата подання заявки:   | <b>06.07.2010</b>                    |  | <b>Сейлеком ван Гейсбердіна Пітернела (NL),</b>  |
| <b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:                                     | <b>25.06.2015</b>                    |  | <b>Гілесен Біанка Елісабет Марія (NL),</b>   |
| <b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:                  | <b>09165229.7</b>                    |  | <b>Брурс Ніколете Ясмейн (NL),</b>   |
| <b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:           | <b>10.07.2009</b>                    |  | <b>Відеман Беате (DE),</b>   |
| <b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:   | <b>EP</b>                            | <b>(73)</b> Власник(и):                                      | <b>ДСМ АЙПІ АСЕТС Б.В.,</b>  |
| <b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:  | <b>25.05.2012, Бюл.№ 10</b>          |  | <b>Het Overloon 1, NL-6411 TE Heerlen, The Netherlands (NL)</b>  |
| <b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:                                    | <b>25.06.2015, Бюл.№ 12</b>          | <b>(74)</b> Представник:                                     | <b>Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25</b>  |
| <b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | <b>РСТ/EP2010/059618, 06.07.2010</b> | <b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | <b>Wisselink H.W. et al., Novel Evolutionary Engineering Approach for Accelerated Utilization of Glucose, Xylose, and Arabinose Mixtures by Engineered Saccharomyces cerevisiae Strains. Applied and environmental microbiology. - 2009. - Vol. 75, № 4, p. 907-914.</b> |
|  |                                      |  | <b>WO 2009011591 A, 22.01.2009</b>   |
|  |                                      |  | <b>WO 2008041840 A, 10.04.2008</b>   |
|  |                                      |  | <b>WO 2009/109633 A, 11.09.2009</b>  |

## (54) СПОСІБ ФЕРМЕНТАЦІЇ ГАЛАКТОЗИ

### (57) Реферат:

Винахід належить до способу отримання одного або більше продуктів ферментації з композиції цукрів, який передбачає ферментацію композиції цукрів у присутності дріжджів, що належать до роду *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* або *Yarrowia*, та вилучення продукту ферментації в якому дріжджі містять гени *araA*, *araB* і *araD*, а композиція цукрів включає глюкозу, галактозу і арабінозу.

UA 108853 C2



Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Винахід відноситься до ферментації змішаних цукрів, зокрема, до ферментації композиції цукрів, яка включає глюкозу, галактозу і арабінозу. Композиція цукрів може бути отримана з лігноцелюлозного матеріалу.

5 Попередній рівень техніки

Велику частину етанолу як альтернативи рідким паливам отримують в даний час ферментацією кукурудзяного крохмалю і сахарози цукрової тростини. Для досягнення поставлених амбітних цілей у виробництві поновлюваних палив розробляються нові технології перетворення (конверсії) нехарчової біомаси в продукти ферментації, такі як етанол. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є тими організмами, які були вибрані промисловістю з виробництва етанолу, але ці дріжджі не здатні утилізувати п'ятиуглецеві цукри, такі, що містяться в геміцелюлозному компоненті біомаси-сировини. Геміцелюлоза може складати до 20%-30% біомаси, причому C5-цукрами, які преважують в ній є ксилоза і арабіноза. Гетерологічна експресія ксилоізомерази (XI) є одним з методів, які сприяють метаболізму дріжджових клітин і ферментації ними ксилози. До того ж експресія бактерійних генів *araA*, *araB* і *araD* в штаммах *S. cerevisiae* призводить до утилізації і ефективного спиртового бродіння арабінози. Галактоза є C6-цукром і до того ж цукром, який часто присутній в лігноцелюлозі, часто в кількостях (~4% загальної маси цукрів), якими недоцільно нехтувати з економічних причин.

20 J. van den Brink et al., *Microbiology* (2009) 155, 1340-1350, указує, що глюкоза є найбільш бажаним джерелом вуглецю для *Saccharomyces cerevisiae* і що при переході від ферментації в умовах обмеженої кількості глюкози до ферментації з надлишком галактози за анаеробних умов галактоза не споживається.

25 До теперішнього часу не розроблений спосіб конверсії галактози в продукт ферментації разом з глюкозою і одним або більше C5-цукром. Тому метою винаходу є забезпечення способу конверсії галактози в продукт ферментації, в одному процесі з глюкозою і одним або більше C5-цукром.

Короткий виклад суті винаходу

Даний винахід пропонує спосіб виробництва одного або більше продуктів ферментації з композиції цукрів, який передбачає наступні стадії:

30 а) ферментація композиції цукрів у присутності дріжджів, які відносяться до роду *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* або *Yarrowia*, і

б) вилучення продукту ферментації

35 і в якому дріжджі містять гени *araA*, *araB* і *araD*, а композиція цукрів включає глюкозу, галактозу і арабінозу.

Переважно цукри – глюкоза, галактоза і арабіноза – перетворюються на продукт ферментації.

Бажано клітина для ферментації змішаних цукрів відноситься до роду *Saccharomyces*, краще – до *Saccharomyces cerevisiae*.

40 Крім того, винахід відноситься до використання генів *araA*, *araB* і *araD* для надання (шляхом експресії цих генів) штаму, який ферментує глюкозу, здатності до анаеробної ферментації галактози у присутності арабінози.

Короткий опис фігур

Фіг. 1 представляє фізичну карту плазмиди pPWT006.

45 Фіг. 2 представляє фізичну карту плазмиди pPWT018.

Фіг. 3 представляє авторадіограму саузерн-блота. Хромосомну ДНК штаму дикого типу CEN.PK113-7D (доріжка 1) і BIE104A2 (доріжка 2) розщеплювали *EcoRI* і *HindIII*. Блот гібридизували із специфічним SIT2-зондом.

50 Фіг. 4 представляє фізичні карти SIT2-локуса дикого типу (панель а) і після введення *ara*-генів інтеграцією плазмиди pPWT018 з подальшою внутрішньомолекулярною рекомбінацією, яка веде до втрати вектора і послідовностей селектованих маркерів (панель б). Вказана гібридизація зонда.

Фіг. 5 представляє фізичну карту плазмиди pPWT080, послідовність якої дана в SEQ ID no. 4.

55 Фіг. 6 представляє фізичну карту GRE3-локуса дикого типу (панель а) і однокопійну інтеграцію PWT080 в GRE3-локус (панель б, яка показує, де зв'язуються праймери, і панель С, яка показує, де зв'язується RKI1-зонд).

Фіг. 7 представляє фізичну карту GRE3-локуса, в якій кодуюча область GRE3-гена замінена інтеграцією PPP-генів *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* і *RPE1*. Панель а показує, де зв'язуються праймери SEQ ID 5 і 6, панель б показує, де зв'язується RKI1-зонд.

60 Фіг. 8 показує криві зростання BIE104P1A2 за аеробних умов на різних середовищах. Штам

BIE104P1A2 заздалегідь вирощували на YNB з 2% галактози. Крива зростання починається на YNB з 2% галактози і 1 % арабінози з подією, яка відбувалася потім, і яка позначеною на графіці цифрою (1), – перенесенням на YNB з 2% арабінози як єдиного джерела вуглецю. Після досягнення OD600 (оптична щільність культури при довжині хвилі 600 нм), рівної >1, культуру переносили на свіже середовище з початковою OD600, рівною 0,2. Після трьох перенесень на чисте арабінозне середовище отриманий штам був позначений як BIE104P1A2с.

Фіг. 9 показує криві зростання BIE104P1A2с за анаеробних умов на середовищі YNB з 2% арабінози як єдиного джерела вуглецю. Після досягнення OD600 більше 1 культуру переносили на свіже середовище з початковою OD600, яка дорівнювала 0,2. Після декількох перенесень отриманий штам отримав назву BIE104P1A2d (= BIE201).

Фіг. 10 показує конверсію цукрів і утворення продукту штамом BIE104 на синтетичному модельному середовищі з кукурудзяними волокнами. Продуктування CO<sub>2</sub> вимірювали постійно. Моніторинг зростання вели до подальшої оптичної щільності культури. Передкультуру вирощували на 2% глюкози.

Фіг. 11 показує конверсію цукрів і утворення продукту штамом BIE104P1A2с на синтетичному модельному середовищі з кукурудзяними волокнами. Продуктування CO<sub>2</sub> вимірювали постійно. Моніторинг зростання вели до подальшої оптичної щільності культури. Передкультуру вирощували на 2% глюкози.

Фіг. 12 показує конверсію цукрів і утворення продукту штамом BIE201 на синтетичному модельному середовищі з кукурудзяними волокнами. Продуктування CO<sub>2</sub> вимірювали постійно. Моніторинг зростання вели до подальшої оптичної щільності культури. Передкультуру вирощували на 2% глюкози.

Фіг. 13 показує конверсію цукрів і утворення продукту штамом BIE104A2 на синтетичному модельному середовищі з кукурудзяними волокнами. Продуктування CO<sub>2</sub> вимірювали постійно. Моніторинг зростання вели до подальшої оптичної щільності культури. Передкультуру вирощували на 2% глюкози.

Фіг. 14 показує конверсію цукрів і утворення продукту штамом BIE105A2 на синтетичному модельному середовищі з кукурудзяними волокнами. Продуктування CO<sub>2</sub> вимірювали постійно. Моніторинг зростання вели до подальшої оптичної щільності культури. Передкультуру вирощували на 2% глюкози.

Фіг. 15 представляє фізичну карту плазмиди pPWT007.

Фіг. 16 представляє фізичну карту плазмиди pPWT042.

Фіг. 17 представляє фізичну карту SIT4-локуса дикого типу (панель а) і однокопійну інтеграцію PWT080 в SIT4-локус (панель б, яка показує, де зв'язуються праймери).

Фіг. 18 показує графічне представлення кривих зростання штаму BIE104A2P1Y9 на різних середовищах. Панель а: штам BIE104A2P1Y9, вирощений на глюкозі, з наступними подіями, позначеними на графіці цифрами (1), – перенесення на (1% арабінози + 1% ксилози) і (2) – перенесення на (2% ксилози + 0,2% арабінози). Панель б: штам BIE104A2P1Y9, вирощений на галактозі, з подальшим (1) перенесенням на (1% арабінози + 1% ксилози) і (2) перенесенням на (2% ксилози + 0,2% арабінози).

Фіг. 19 показує зростання штаму BIE104A2P1Y9 на Verduyn-середовищі з додаванням 2 % ксилози. Були протестовані дві автономні колонії. Після досягнення OD600, рівної 2, штами переносили на свіже середовище, на якому вони відразу починали знов рости на ксилозі.

Фіг. 20 представляє фізичну карту плазмиди rGBS416ARAABD.

Короткий опис списку послідовностей

SEQ ID NO: 1 представляє послідовність ксилоізомерази з штаму дикого типу *Bacteroides uniformis* ATCC 8492. Genbank accession no. AAYH02000036.

SEQ ID NO: 2 представляє кодон-оптимізовану послідовність з SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 представляє амінокислотну послідовність ксилоізомерази з *Bacteroides uniformis* ATCC 8492.

SEQ ID NO: 4 представляє послідовність плазмиди pPWT080.

SEQ ID NO: 5 представляє послідовність прямого праймера.

SEQ ID NO: 6 представляє послідовність зворотного праймера.

SEQ ID NO: 7 представляє послідовність прямого багатофункціонального праймера для ПЛР-діагностики.

SEQ ID NO: 8 представляє послідовність зворотного багатофункціонального праймера для ПЛР-діагностики.

SEQ ID NO: 9 представляє послідовність RKI1-зонда прямого праймера.

SEQ ID NO: 10 представляє послідовність RKI1-зонда зворотного праймера.

SEQ ID NO: 11 представляє послідовність kanMX-касети прямого праймера.

SEQ ID NO: 12 представляє послідовність капМХ-касети зворотного праймера.

SEQ ID NO: 13 представляє послідовність прямого праймера.

SEQ ID NO: 14 представляє послідовність зворотного праймера.

5 SEQ ID NO: 15 представляє послідовність прямого багатофункціонального праймера для ПЛР-діагностики.

SEQ ID NO: 16 представляє послідовність зворотного багатофункціонального праймера для ПЛР-діагностики.

SEQ ID NO: 17 представляє послідовність плазмиди pPWT018.

10 SEQ ID NO: 18 представляє послідовність інтегруючої плазмиди pPWT018 прямого праймера.

SEQ ID NO: 19 представляє послідовність інтегруючої плазмиди pPWT018 зворотного праймера.

SEQ ID NO: 20 представляє послідовність SIT2-зонда прямого праймера.

SEQ ID NO: 21 представляє послідовність SIT2-зонда зворотного праймера.

15 SEQ ID NO: 22 представляє послідовність прямого праймера для ампліфікації касети експресії araABD.

SEQ ID NO: 23 представляє послідовність зворотного праймера для ампліфікації касети експресії araABD.

Докладний опис винаходу

20 У даному описі і доданій формулі винаходу слова – «містити» і «включати» та, а також їхні похідні, такі як «включає», «містить», «який включає», «який містить», слід трактувати як «які утримують в собі». Тобто ці слова вживаються для вираження можливого включення інших елементів або цілих чисел, не вказаних конкретно там, де це дозволяє контекст.

25 Слова, які використовуються в однині також позначають множину. Наприклад, елемент може означати один елемент або більше ніж один елемент.

Різні варіанти здійснення винаходу, описані тут, можна перехресно комбінувати один з одним.

Композиція цукрів

30 Композиція цукрів відповідно до винаходу включає глюкозу, арабінозу і галактозу. У способі запропонованому винаходом цукри глюкоза, арабіноза і галактоза переважно перетворюються (конвертуються) на продукт ферментації.

У винаході може використовуватися будь-яка композиція цукрів, яка задовольняє вказаним критеріям. У одному з кращих варіантів здійснення винаходу композиція цукрів є гідролізатом одного або більше лігноцелюлозних матеріалів. Лігноцелюлоза в контексті опису включає геміцелюлозу і геміцелюлозні частини біомаси. Лігноцелюлоза включає також лігноцелюлозні фракції біомаси. Придатні лігноцелюлозні матеріали можна знайти в наступному переліку: відходи фруктових садів, чапарель (субтропічна твердолиста чагарникова рослинність), відходи мукомельного виробництва, міські деревні відходи, побутові відходи, лісосічні відходи, відходи від проріджування лісів, деревні культури з короткими періодами ротації, промислові відходи, пшенична солома, вівсяна солома, рисова солома, ячмінна солома, житня солома, льняна солома, оболонки соєвих бобів, рисове лушпиння, рисова солома, кукурудзяний глютенівий корм (кукурудзяна мезга), вівсяне лушпиння, цукрова тростина, грубі рослинні залишки від прибирання кукурудзи, кукурудзяні стебла, стрижні кукурудзяних качанів, листя, які обгортають кукурудзяні качани, просо прутувидне, міскантус (ряд багаторічних трав'янистих рослин сімейства злаків), сорго цукрове, стебла каноли, стебла сої, високотравна рослинність прерій, гамаграс (трипсакум щитовидний; дикий родич кукурудзи), лисохвіст (рід багаторічних лугових трав сімейства злаків); цукрово-буряковий жом, вичавки цитрусових плодів, оболонки насіння, целюлозні відходи при утриманні тварин, скошена трава газонів, бавовник, морські водорості, дерева, дерева з м'якою деревиною, дерева з твердою деревиною, тополі, сосни, чагарники, злакові трави, пшениця, пшенична солома, багаса цукрової тростини, кукурудза, листя, які обгортають кукурудзяні качани, стрижні кукурудзяних качанів, насіння кукурудзи, волокно з насіння, продукти і побічні продукти мокрого або сухого способу помелу зерна, тверді побутові відходи, паперові відходи, відходи скотних дворів, трав'янистий матеріал, сільськогосподарські залишки, лісосічні залишки, тверді побутові відходи, паперові відходи, пульпа, відходи паперових фабрик, гілки, чагарники, очерет, кукурудза, листя, які обгортають кукурудзяні качани, енергетична культура, лісокультура, плоди, квітки, зерно, трава, трав'яниста культура, листя, вторинна кора, глиця, колоди, кореневища, молоді пагони, чагарникові рослини, просо прутувидне, дерево, овочеві культури, шкірка плодів, в'юнкі рослини, цукрово-буряковий жом, пшенична крупа, вівсяне лушпиння, тверда або м'яка деревина, органічні відходи від переробки сільськогосподарської сировини, лісосічні відходи або комбінація будь-яких двох або більше з

поміж перерахованого вище.

- 5 Перелік деяких придатних композицій цукрів, отриманих з лігноцелюлози, і композиція гідролізату цукрів приводяться в табл. 1. Перераховані лігноцелюлози включають стрижні кукурудзяних качанів, кукурудзяну клітковину, рисове лушпиння, шкірку дині, цукрово-буряковий жом, пшеничну солому, багасу цукрової тростини, деревину, трав'янисті рослини і вичавки від пресування оливок.

Таблица 1

Перелік композицій цукрів з лігноцелюлозних матеріалів. Gal=галактоза, Xyl=ксилоза, Ara=арабіноза, Man=маноза, Glu=глутамат, Rham=рамноза.  
Вказані процентний вміст галактози (% Gal) і літературне джерело

| Лігноцелюлозний матеріал                              | Gal | Xyl | Ara | Man | Glu | Rham | Разом   | %Gal Джерела інформації: |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|---------|--------------------------|
| Стрижень кукурудзяного качана а                       | 10  | 286 | 36  |     | 227 | 11   | 570     | 1,7 (1)                  |
| Стрижень кукурудзяного качана б                       | 131 | 228 | 160 |     | 144 |      | 663     | 19,8 (1)                 |
| Рисове лушпиння а                                     | 9   | 122 | 24  | 18  | 234 | 10   | 417     | 2,2 (1)                  |
| Рисове лушпиння б                                     | 8   | 120 | 28  |     | 209 | 12   | 378     | 2,2 (1)                  |
| Шкірки дині   | 6   | 120 | 11  |     | 208 | 16   | 361     | 1,7 (1)                  |
| Цукрово-буряковий жом                                 | 51  | 17  | 209 | 11  | 211 | 24   | 523     | 9,8 (2)                  |
| Пшенична солома айдахо                                | 15  | 249 | 36  |     | 396 |      | 696     | 2,2 (3)                  |
| Кукурудзяна клітковина                                | 36  | 176 | 113 |     | 372 |      | 697     | 5,2 (4)                  |
| Багаса цукрової тростини                              | 14  | 180 | 24  | 5   | 391 |      | 614     | 2,3 (5)                  |
| Грубі рослинні залишки кукурудзи                      | 19  | 209 | 29  |     | 370 |      | 626     | (6)                      |
| Тамарикс гіллястий (деревина)                         | 5   | 118 | 7   | 3   | 493 |      | 625     | 0,7 (7)                  |
| Евкалипт (деревина)                                   | 22  | 105 | 8   | 3   | 445 |      | 583     | 3,8 (7)                  |
| CWR (трав'яниста рослина)                             | 8   | 165 | 33  |     | 340 |      | 546     | 1,4 (7)                  |
| JTW (трав'яниста рослина)                             | 7   | 169 | 28  |     | 311 |      | 515     | 1,3 (7)                  |
| MSW (тверді побутові відходи)                         | 4   | 24  | 5   | 20  | 440 |      | 493     | 0,9 (7)                  |
| Очеретянка звичайна (Phalaroides arundinacea) стебло  | 16  | 117 | 30  | 6   | 209 | 1    | 379     | 4,2 (8)                  |
| Очеретянка звичайна (Phalaroides arundinacea) насіння | 13  | 163 | 28  | 6   | 265 | 1    | 476     | 2,7 (9)                  |
| Вичавки від пресування оливок                         | 15  | 111 | 24  | 8   | 329 |      | 487     | 3,1 (9)                  |
|   |     |     |     |     |     |      | Середнє | 3,8                      |

- 10 З таблиці 1 видно, що у вказаних лігноцелюлозних матеріалах значна кількість (в середньому 3,8%) в загальному вмісті цукрів складає галактоза. Тому конверсія галактози в продукт ферментації має важливе економічне значення.

Клітина для ферментації змішаних цукрів

- 15 Визначення клітини для ферментації змішаних цукрів, яка несе гени araA, araB і araD, подано нижче. Вона здатна ферментувати глюкозу, арабінозу і галактозу. У одному варіанті здійснення винаходу клітина для ферментації змішаних цукрів здатна ферментувати один або більше додаткових цукрів, переважно C5- і/або C6-цукрів. У одному з варіантів здійснення винаходу клітина для ферментації змішаних цукрів містить один або більше xylA- і/або XKS1-генів, що дозволяє клітині для ферментації змішаних цукрів ферментувати ксилозу; делеція гена альдозоредуктази (GRE3); гіперекспресія PPP-генів TAL1, TKL1, RPE1 і RKI1 дозволяють

- 20 збільшити метаболічний потік через пентозофосфатний шлях в клітині.  
У одному варіанті здійснення винаходу клітина для ферментації змішаних цукрів здатна

ферментувати один або більше додаткових цукрів, переважно С5- і/або С6-цукрів. У одному з варіантів здійснення винаходу клітина для ферментації змішаних цукрів має один або більше хylA-, XYL1- і XYL2-генів і/або XKS1-генів, що дозволяє клітині для ферментації змішаних цукрів ферментувати ксилоту; делеція гена альдозоредуктази (GRE3); гіперекспресія PPP-генів TAL1, TKL1, RPE1 і RKI1 дозволяють збільшити метаболічний потік через пентозофосфатний шлях в клітині.

У одному з варіантів клітина для ферментації змішаних цукрів є промисловою клітиною, краще – промисловими дріжджами.

Промисловій клітині і дріжджовій промисловій клітині можна дати наступне визначення. Умови життя (дріжджових) клітин в промислових процесах істотно відрізняються від умов життя цих клітин в лабораторії. Промислові дріжджові клітини повинні бути здатні добре працювати за самих різних умов зовнішнього середовища, які можуть змінюватися в ході процесу. Такі зміни включають зміни джерела поживних речовин, рН, концентрації етанолу, температури, концентрації кисню тощо, які в своїй сукупності потенційно впливають на зростання клітин і продуктування етанолу дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*. За несприятливих промислових умов толерантні до зовнішнього середовища штами повинні демонструвати стійке зростання і продуктивність. Промислові штами дріжджів в більшості випадків стійкіші до перерахованих вище змін умов навколишнього середовища, які можуть відбуватися в місцях використання цих штамів, наприклад, в хлібопекарській промисловості, пивоварній промисловості, виноробстві і виробництві етанолу. У одному варіанті здійснення винаходу промислова клітина для ферментації змішаних цукрів конструюється на основі промислової клітини-хазяїна, причому це конструювання проводиться таким чином, як це описано нижче. Прикладами промислових дріжджів (*S. cerevisiae*) є Ethanol Red® (Fermentis), Fermiol® (DSM) і Thermosacc® (Lallemand).

У одному з варіантів здійснення винаходу клітина для ферментації змішаних цукрів є толерантною до інгібіторів. Толерантність до інгібіторів – це стійкість до інгібуючих сполук. Присутність і рівень вмісту інгібуючих сполук в лігноцелюлозі можуть змінюватись в широких межах залежно від сировини, способу попередньої обробки, процесу гідролізу. Прикладами категорій інгібіторів є карбонові кислоти, фуран і/або фенольні сполуки. Прикладами карбонових кислот є молочна кислота, оцтова кислота або мурашина кислота. Прикладами фурану є фурфурол і гідроксиметилфурфурол. Прикладами фенольних сполук є ванілін, бузкова кислота, ферулова кислота і кумарова кислота. Типові кількості інгібіторів, таких як карбонові кислоти, складають від декількох грамів/літр до 20 грамів/літр або більше, залежно від сировини, попередньої обробки і умов гідролізу. Для фурану ці кількості складають від декількох сотень міліграмів/літр до декількох грамів/літр залежно від сировини, попередньої обробки і умов гідролізу. Для фенольних сполук ці кількості складають від декількох десятків міліграмів/літр до 1 грама/літр залежно від сировини, попередньої обробки і умов гідролізу.

Штами для ферментації змішаних цукрів відповідно до винаходу є стійкими до інгібіторів, тобто вони можуть протистояти звичайним інгібіторам при концентрації, яка досягається в типових випадках за загальноприйнятих умов попередньої обробки і гідролізу, так що штами для ферментації змішаних цукрів можуть знайти широке застосування, тобто вони показують широкий спектр можливостей застосування для різних видів сировини, різних способів попередньої обробки і різних умов гідролізу.

У одному варіанті здійснення винаходу промислова клітина для ферментації змішаних цукрів конструюється на основі толерантної до інгібіторів клітини-хазяїна, причому конструювання клітини проводиться, як це описано нижче. Толерантні до інгібіторів клітини-хазяїни можуть підбиратися скринінгом штамів, які вирощують на матеріалах, що містять інгібітори, таких як представлені Kadar et al. у Appl. Biochem. Biotechnol. (2007), Vol. 136-140, 847-858; авторами був відібраний толерантний до інгібіторів штам *S. cerevisiae* ATCC 26602.

У одному з варіантів здійснення винаходу клітина для ферментації змішаних цукрів не містить маркера. У контексті опису термін «маркер» відноситься до гена, який кодує ознаку або фенотип, який робить можливим відбір або скринінг з метою відбору клітини-хазяїна, що містить маркер. «Не містить маркера» означає, що в клітині для ферментації змішаних цукрів маркери переважно відсутні. Відсутність маркера є особливо вигідним в тому випадку, якщо при конструюванні клітини для ферментації змішаних цукрів використовувалися антибіотикові маркери, які згодом були видалені. Видалення маркерів може здійснюватися будь-яким придатним методом попереднього рівня техніки, наприклад, внутрішньомолекулярною рекомбінацією. Придатний метод видалення маркерів описаний в прикладах.

Клітина для ферментації змішаних цукрів може проявляти здатність до конверсії рослинної біомаси, целюлози, геміцелюлоз, пектинів, рамнози, галактози, фруктози, мальтози, мальтодекстринів, рибози, рибулози або крохмалю, похідних крохмалю, сахарози, лактози і

гліцерину, наприклад, у придатні для ферментації цукри. Отже, клітина для ферментації змішаних цукрів може експресувати один або більше ферментів, таких як целюлаза (ендоцелюлаза або екзоцелюлаза) і геміцелюлаза (ендо- або екзоксиланаза або арабіназа), необхідна для конверсії целюлози в мономери глюкози і геміцелюлози в мономери ксилози і арабінози; пектиназа, здатна конвертувати пектини в глюкуронову кислоту і галактуринову кислоту, або амілаза, здатна конвертувати крохмаль в мономери глюкози.

Крім того, клітина для ферментації змішаних цукрів може проявляти ферментативну активність, потрібну для конверсії пірувату в бажаний продукт ферментації, такий як етанол, бутанол, молочна кислота, 3-гідроксипропіонова кислота, акрилова кислота, оцтова кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, фумарова кислота, яблучна кислота, ітаконова кислота, амінокислота, 1,3-пропандіол, етилен, гліцерин, -лактамний антибіотик або цефалоспорин.

У одному з варіантів здійснення винаходу клітина для ферментації змішаних цукрів є клітиною, яка за своєю природою здатна викликати спиртове бродіння, бажано – анаеробне спиртове бродіння. Клітина для ферментації змішаних цукрів бажано проявляє високу стійкість до етанолу, високу стійкість до низького pH (тобто здатна до зростання при pH нижче приблизно 5, приблизно 4, приблизно 3 або приблизно 2,5) і органіки і/або високої стійкості до підвищених температур.

Будь-яка з вищеперелічених характеристик або активностей клітини для ферментації змішаних цукрів може від природи бути присутньою в клітині або може бути введена в клітину або змінена за допомогою генетичної модифікації.

Конструювання штаму для ферментації змішаних цукрів

Гени можуть вводитися в клітину для ферментації змішаних цукрів шляхом введення в клітину-хазяїна:

а) кластера, який складається з PPP-генів TAL1, TKL1, RPE1 і RKI1, під контролем сильних промоторів

б) кластера, який складається з xylA-гена і XKS1-гена, обидва під контролем конститутивних промоторів

с) кластера, який складається з генів araA, araB і araD, і/або кластера з xylA-гена і/або XKS1-гена і

д) делеції гена альдозоредуктази

і адаптивної еволюції для отримання клітини для ферментації змішаних цукрів. Вказана клітина може бути сконструйована методами рекомбінантної експресії.

Рекомбінантна експресія

Клітина винаходу є рекомбінантною клітиною. Тобто клітина запропонована винаходом містить або трансформується або генетично модифікується нуклеотидною послідовністю, яка від природи не зустрічається в даній клітині.

Методи рекомбінантної експресії ферментів в клітині, а також додаткових генетичних модифікацій клітини запропонованої винаходом добре відомі фахівцям, кваліфікованим в даній галузі техніки. У типових випадках такі методи включають трансформацію клітини нуклеїнокислотним конструктором, який містить релевантну послідовність. Такі методи відомі, наприклад, із стандартних довідників, таких як Sambrook & Russel (2001) «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, або F. Ausubel et al., eds., «Current protocols in molecular biology», Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Методи трансформації і генетичної модифікації грибних клітин-хазяїнів відомі, наприклад, з EP-A-0635574, WO 98/46772, WO 99/60102, WO 00/37671, WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 і US 6 265 186.

У типових випадках нуклеїнокислотний конструктор може бути плазмідною, наприклад, малокопійною плазмідною або мультикопійною плазмідною. Клітина запропонована даним винаходом може містити одну або багато копій нуклеотидної послідовності, яка кодує фермент, наприклад, за рахунок багатьох копій нуклеотидного конструктора або за рахунок використання конструктора, який містить велику кількість копій послідовності, що кодує фермент.

Нуклеїнокислотний конструктор може підтримуватися епісомально і, отже, містити послідовність для автономної реплікації, таку як аутосомно-реплікована послідовність.

Придатний епісомний нуклеїнокислотний конструктор може мати як основу, наприклад, дріжджові 2μ- або pKD1-плазмиди (Gleer et al., 1991, Biotechnology 9: 968-975), або AMA-плазмиди (Fierro et al., 1995, Curr Genet. 29: 482-489). Альтернативно, кожен нуклеїнокислотний конструктор може інтегруватися в одній або більше копіях в геном клітини. Інтеграція в геном клітини може відбуватися випадково шляхом негомолігічної рекомбінації, але бажано нуклеїнокислотний конструктор може інтегруватися в геном клітини гомологічною рекомбінацією, що є добре відомим з рівня техніки (див., напр., WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 і US



6 265 186).

Більшість епісомальних плазмід або 2μ-плазмід є відносно нестабільними і втрачаються приблизно в  $10^{-2}$  або більше клітинах в кожному поколінні. Навіть за умов селективного зростання тільки від 60% до 95% клітин зберігають епісомальну плазмиду. Копійність більшості епісомних плазмід коливається від 10 до 40 на клітину  $\text{sig}^+$  штамів-хазяїнів. Проте плазмиди нерівномірно розподіляються серед клітин, і спостерігається значна варіабельність в кількості копій на клітину в популяціях. Штами, трансформовані інтеграційними плазмідами, є високостабільними, навіть за відсутності селективного тиску. Проте втрата плазмід може відбуватися приблизно з  $10^{-3}$  –  $10^{-4}$  частотою в результаті гомологічної рекомбінації між тандемною повтореною ДНК, приводячи до випетлювання послідовності вектора. Переважно конструкція вектора у випадку стабільної інтеграції така, що після втрати селективних маркерних генів (яка також відбувається в результаті внутрішньомолекулярної гомологічної рекомбінації) вказане випетлювання інтегрованого конструкта стає неможливим. Тому гени переважно інтегруються стабільно. Стабільна інтеграція в контексті опису визначається як інтеграція в геном, в якій випетлювання інтегрованого конструкта стає неможливим. Бажано селективні маркери відсутні. У типових випадках послідовність, яка кодує фермент, функціонально зв'язуватиметься з однією або більше нуклеїноокислотними послідовностями, здатними забезпечити або полегшити транскрипцію і/або трансляцію послідовності, яка кодує фермент.

Термін «функціонально зв'язуватися» відноситься до положення контакту, в якому описані компоненти знаходяться у взаємодії, що дозволяє їм функціонувати властивим їм чином. Наприклад, промотор або енхансер функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, при цьому вказаний промотор або енхансер впливає на транскрипцію кодуючої послідовності.

У контексті опису термін «промотор» відноситься до фрагмента нуклеїнової кислоти, який виконує функцію контролю транскрипції одного або більше генів, які локалізуються перед (за напрямком транскрипції) сайтом ініціації транскрипції гена, і структурно ідентифікується присутністю сайту скріплення ДНК-залежної РНК-полімерази, сайтів ініціації транскрипції та іншої ДНК-послідовності, відомих фахівцям в даній галузі техніки. «Конститутивний» промотор – це промотор, який є активним за більшості умов зовнішнього середовища і умов розвитку. «Індуцибельний» промотор – це промотор, який є активним при регулюванні умов зовнішнього середовища або умов розвитку.

Промотор, який може використовуватися для досягнення експресії нуклеотидної послідовності, яка кодує фермент згідно даному винаходу, може не бути нативним промотором експресованої нуклеотидної послідовності, яка кодує фермент, тобто промотором, гетерологічним до нуклеотидної послідовності (кодуючої послідовності), з якою він функціонально зв'язаний. Проте промотор може бути гомологічним, тобто ендеогенним, по відношенню до клітини-хазяїна.

Промотори є широко доступними і відомими кваліфікованому фахівцеві. Відповідні приклади таких промоторів включають, наприклад, промотори з гліколітичних генів, такі як промотори фосфоглюкокінази (PFK), триозо-фосфатізомераз (TPI), гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GPD, TDH3 або GAPDH), піруваткінази (PYK), фосфогліцераткінази (PGK) з дріжджів або міцеліальних грибів; докладнішу інформацію про такі промотори з дріжджів можна знайти в (WO 93/03159). Іншими корисними промоторами є промотори генів, які кодують рибосомальні білки, промотор гена лактази (LAC4), промотори алкогольдегідрогенази (ADH1, ADH4 і ін.) і промотор енолази (ENO). Інші промотори, як конститутивні, так і індуцибельні, і енхансери або розташовані вище активуючі послідовності відомі кваліфікованому в даній галузі техніки фахівцеві. Промотори, які використовуються в клітинах-хазяїнах винаходу, можуть бути за необхідності піддані модифікації з метою впливу на їх функцію (характеристики) контролю. Придатні в даному контексті промотори включають як конститутивні, так і індуцибельні природні промотори, а також сконструйовані промотори, які добре відомі кваліфікованому в даній галузі техніки фахівцеві. Придатними промоторами в еукаріотичних клітинах-хазяїнах можуть бути GAL7, GAL10 або GAL1, CYC1, HIS3, ADH1, PGL, PH05, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO1, TPI1 і AOX1. Інші придатні промотори включають PDC1, GPD1, PGK1, TEF1 і TDH3.

У клітині запропонованій винаходом 3'-кінець послідовності нуклеотидів, яка кодує фермент, бажано пов'язаний функціонально з послідовністю термінатора транскрипції. Бажано щоб послідовність термінатора функціонувала у відібраній клітині-хазяїні, такий як, наприклад, відібрані види дріжджів. У будь-якому випадку вибір термінатора не є критичним; він може бути отриманий, наприклад, з будь-якого дріжджового гена, хоча іноді термінатори можуть працювати, навіть якщо вони отримані не з гена дріжджів, а з гена іншого еукаріота. Зазвичай

послідовність нуклеотидів, яка кодує фермент, містить термінатор. Бажано такі термінатори комбінуються з мутаціями щоб уникнути антисмислового розпаду мРНК в клітині-хазяїні винаходу (див., наприклад, Shirley et al., 2002, Genetics 161:1465-1482).

Послідовність, яка термінує транскрипцію, переважно включає також сигнал поліаденилювання.

У нуклеїнокислотному конструкті, придатному для використання у винаході, необов'язково може бути присутнім селектований маркер. У контексті опису термін «маркер» відноситься до гена, який кодує ознаку або фенотип, який дозволяє проводити відбір або скринінг на клітину-хазяїна, яка містить маркер. Маркерний ген може бути геном стійкості до антибіотиків, причому відповідний антибіотик може використовуватися для відбору трансформованих клітин серед нетрансформованих клітин. Приклади придатних маркерів стійкості до антибіотиків включають, наприклад, дигідрофолатредуктазу, гігromіцин-В-фосфотрансферазу, 3'-О-фосфотрансферазу II (стійкість до канаміцину, неоміцину і G418). Маркери стійкості до антибіотику можуть бути найбільш зручними для трансформації поліплоїдних клітин-хазяїнів. Можуть використовуватися і маркери нестійкості до антибіотиків, такі як ауксотрофні маркери (URA3, TRP1, LEU2) або TRP1 ген з *S. pombe* (описаний Russell P.R., 1985, Gene 40: 125-130). У одному з кращих варіантів здійснення винаходу клітини-хазяїні, трансформовані нуклеїнокислотними конструктами, не містять маркерних генів. Методи конструювання рекомбінантних мікробних клітин-хазяїнів, які не містять маркерних генів, розкриваються в EP-A-O 635 574 і ґрунтуються на використанні двонаправлених маркерів, таких як ген *amdS* (ацетамідази) з *A. nidulans* або гени дріжджів URA3 і LYS2. Альтернативно, скринований маркер, такий як зелений флуоресцюючий білок, *lacL*, люцифераза, хлорамфенікол-ацетилтрансфераза, бета-глюкуронідаза, може вводитися в нуклеїнокислотні конструкти винаходу, що дозволяє проводити скринінг на трансформовані клітини.

Необов'язкові додаткові елементи, які можуть бути присутніми в нуклеїнокислотних конструктах, придатних для використання у винаході, включають, але весь перелік не обмежується тільки названими тут, одну або більше з лідерних послідовностей, енхансерів, чинників інтеграції і/або репортерних генів, інтронів, центромер, теломер і/або послідовностей ділянок прикріплення до ядерного матриксу (MAR). Крім цього, нуклеїнокислотні конструкти запропоновані винаходом можуть включати послідовність для автономної реплікації, таку як ARS-послідовність.

Таким чином, процес рекомбінації може здійснюватися відомими методами рекомбінації. Кваліфікованим в даній галузі техніки фахівцям відомі різні прийоми для експресії і гіперекспресії ферментів в клітині запропонованій винаходом. Зокрема, може бути здійснена гіперекспресія ферменту шляхом збільшення числа копій гена, який кодує фермент в клітині-хазяїні, наприклад, шляхом інтеграції додаткових копій гена в геном клітини-хазяїна, шляхом експресії гена з вектора епісомальної мультикопійної експресії або шляхом введення вектора епісомальної експресії, який містить множинні копії гена.

Альтернативно, гіперекспресія ферментів в клітинах-хазяїнах винаходу може досягатися за допомогою промотору, який не є нативним послідовності, що кодує гіперекспресуємий фермент, тобто промотору, який є гетерологічним кодуючої послідовності, з якою він функціонально зв'язаний. Хоча промотор бажано є гетерологічним щодо кодуючої послідовності, з якою він функціонально зв'язаний, але краще також, якщо промотор є гомологічним, тобто ендегенним, щодо клітини-хазяїна. Переважно гетерологічний промотор здатний проводити підвищений стійкий рівень транскрипту, що включає кодуючу послідовність (або здатний проводити більше молекул транскрипту, тобто молекул мРНК, в одиницю часу), чим промотор, що є нативним кодуючої послідовності. Придатні в даному контексті промотори включають як конститутивні, так і індукційбельні природні промотори, а також сконструйовані промотори.

У одному з варіантів здійснення винаходу клітина для ферментації змішаних цукрів не містить маркерів, що означає, що ауксотрофні або домінуючі маркери, зокрема, маркери стійкості до антибіотику не присутні в геномі клітини або поза хромосомами.

Кодуюча послідовність, яка використовується для гіперекспресії вищезазначених ферментів, бажано може бути гомологічною до клітини-хазяїна за винаходом. Проте можуть також використовуватися кодуючі послідовності, які є гетерологічними щодо клітини-хазяїна.

Гіперекспресія ферменту в контексті продукування цього ферменту в генетично модифікованій клітині означає, що фермент продукується за підвищеного рівня специфічної ферментативної активності в порівнянні з немодифікованою клітиною-хазяїном за ідентичних умов. Зазвичай це означає, що ферментативний активний білок (або білки у випадку мультисубодиничних ферментів) продукується в підвищених кількостях або швидше за підвищеного стійкого рівня у порівнянні з немодифікованою клітиною-хазяїном за ідентичних

умов. Так само, це зазвичай означає, що мРНК, яка кодує ферментативний активний білок, утворюється в підвищених кількостях або швидше за підвищеного стійкого рівня в порівнянні з немодифікованою клітиною-хазяїном за ідентичних умов. Бажано в клітині-хазяїні запропонованій винаходом яка піддається гіперекспресії фермент гіперекспресується, щонайменше, приблизно в 1,1, приблизно в 1,2, приблизно в 1,5, приблизно в 2, приблизно в 5, приблизно в 10 або приблизно в 20 разів у порівнянні з штамом, який є генетично ідентичним, за винятком генетичної модифікації, яка викликає гіперекспресію. Саме собою зрозуміло, що ці рівні гіперекспресії можна застосувати і до стійкого рівня ферментної активності, до стійкого рівня ферментного білка, а також до стійкого рівня транскрипту, який кодує фермент.

#### Адаптація

Адаптація – це еволюційний процес, в ході якого популяція стає краще пристосованого (адаптованого) до умов середовища або місць існування. Цей процес має місце протягом від декількох до багатьох генерацій і є одним з основних явищ в біології.

Термін «адаптація» може також відноситися до специфічної ознаки, яка є особливо важливою для виживання організму. Такого роду адаптації приводять до мінливості популяції за рахунок появи краще пристосованих форм, здатних успішніше народжувати потомство, за рахунок природного відбору.

Зміну умов навколишнього середовища змінюють результати природного відбору, які впливають на селективні переваги подальших адаптацій, які покращують пристосованість організму до нових умов. У випадку екстремальних змін навколишнього середовища виникнення і закріплення сприятливих адаптацій можуть бути дуже важливими для виживання. Велике число різних чинників, таких як, наприклад, доступність поживних речовин, температура, доступність кисню тощо, може стимулювати адаптивну еволюцію.

#### Пристосованість

Існує чіткий взаємозв'язок між здатністю до адаптації (здатністю організму виживати і народжувати потомство за даної сукупності умов місця існування) і пристосованістю. Пристосованість – це оцінка та інструмент прогнозування швидкості природного відбору. В результаті природного відбору відносна частота альтернативних фенотипів варіюватиме в часі, якщо вони успадковуватимуться.

#### Генетичні зміни

Якщо природний відбір впливає на генетичну варіабельність популяції, то генетичні зміни є основоположним механізмом його впливу. Під цим мають на увазі, що популяція генетично адаптується до умов навколишнього середовища. Генетичні зміни можуть виявлятися у видимих структурах або можуть регулювати фізіологічну активність організму так, щоб останній пристосувався до зміненого місця існування.

#### Адаптивна еволюція

Клітини для ферментації змішаних цукрів в процесі свого отримання піддаються адаптивній еволюції. Клітина запропонована винаходом може бути адаптована до утилізації цукрів шляхом відбору мутантів, що або виникають спонтанно, або є індукованими (наприклад, радіацією або хімікатами), для зростання на бажаному цукрі, бажано як єдиному джерелі вуглецю, краще – за анаеробних умов. Відбір мутантів може здійснюватися методами, які включають послідовне перенесення культур, як описано, наприклад, в Kuiper et al. (2004, FEMS Yeast Res. 4: 655-664), або культивуванням за селективного тиску в хеомостатній культурі. Наприклад, в кращій клітині-хазяїні запропонованій винаходом, щонайменше, одна з описаних вище генетичних модифікацій, включаючи модифікації, отримані відбором мутантів, надає клітині-хазяїну здатності до зростання на ксилізі як джерелі вуглецю, бажано – як єдиному джерелі вуглецю і краще – за анаеробних умов. Бажано клітина не продукує, в основному, ксилітолу, наприклад, продукує ксилітол в кількостях, нижчих від межі виявлення, або, наприклад, в кількостях менше приблизно 5, менше 2, менше 1, менше 0,5 або менше 0,3% спожитого вуглецю в перерахунок на молярну основу.

Адаптивна еволюція описана також, наприклад, в Wisselink H.W. et al., Applied and Environmental Microbiology, Aug. 2007, p. 4881–4891.

У одному варіанті адаптивної еволюції застосовується режим, який включає повторне періодичне культивування з повторними циклами послідовного зростання на різних середовищах, наприклад, на трьох середовищах різного складу (глюкоза, ксиліза і арабіноза; ксиліза і арабіноза). Див. Wisselink et al. (2009) Applied and Environmental Microbiology, Feb. 2009, p. 907–914.

#### Трансформація дріжджів і генетична стабільність

Початок генної інженерії, тобто трансформації дріжджових клітин рекомбінантною ДНК, вперше було здійснено в 1978 р. [Beggs, 1978; Hinnen et al., 1978]. З того часу метод

рекомбінантних ДНК в дріжджах став загальноновизнаним. На даний час доступними є багато різних векторних конструктів. В більшості своїй це плазмідні вектори, які називаються човниковими векторами, містять генетичний матеріал з векторів *E.coli*, що складаються з оридгину реплікації (точки початку реплікації) і селектованого маркера (часто гена  $\beta$ -lactamase – *ampR*), що робить можливою їх реплікацію в *E.coli* перед трансформацією в дріжджові клітини. До того ж човникові вектори містять селектований маркер для селекції в дріжджах. Маркерами можуть бути гени, які кодують ферменти для синтезу конкретної амінокислоти або нуклеотиду, так що клітини, які несуть відповідну геномну делецію (або мутацію) для створення ауксотрофії або автотрофії, комплементуються. Альтернативно, ці вектори містять гетерологічні домінуючі маркери стійкості, які надають рекомбінантним дріжджовим клітинам (тобто клітинам, до яких введена рекомбінантна ДНК і які експресують маркерний ген) стійкості до певних антибіотиків, таких як g418 (генетицин), гігromіцин В або флеміцин. На додачу до цього, вказані вектори можуть містити послідовність (комбінованих) сайтів рестрикції (сайт множинного клонування або MCS), яка дозволяє клонувати чужорідну ДНК в цих сайтах, хоча існують і альтернативні методи.

Традиційний чотири типи човникових векторів можуть розрізнятися за відсутністю або наявністю додаткових генетичних елементів.

- Інтеграційні плазмідні (YIp), які в результаті гомологічної рекомбінації інтегруються в геном хазяїна в локус маркера або іншого гена, коли останній відкривається рестрикцією, і лінеаризована ДНК використовується для трансформації дріжджових клітин. В більшості випадків це призводить до присутності однієї копії чужорідної ДНК, інсеркованої в цей конкретний сайт в геномі.

- Епісомальні плазмідні (YEр), які несуть частину ДНК-послідовності плазмід 2  $\mu$ , необхідну для автономної реплікації в дріжджових клітинах. Множинні копії трансформованої плазміді розмножуються в дріжджовій клітині і підтримуються як епісоми.

- Плазмідні, які автономно реплікуються (YRp), які несуть оридгін реплікації дріжджів (ARS = послідовність, яка автономно реплікується), що дозволяє трансформованим плазмідам розмножуватися в декілька сотень разів.

- CEN плазмідні (YCp), які на додачу до ARS-послідовності несуть ще центромерну послідовність (отриману з однієї з ядерних хромосом), яка зазвичай гарантує стабільну мітотичну сегрегацію і зазвичай скорочує число копій самореплікувальної плазміді до однієї.

Ці плазмідні вводяться в дріжджові клітини трансформацією. Трансформація дріжджових клітин може досягатися декількома різними методами, такими як методи пермеабілізації клітин ацетатом літію (Ito et al., 1983) і електропорації.

При промисловому застосуванні рекомбінантних мікроорганізмів найбільш важливою проблемою є нестабільність плазмід. Нестабільність – це схильність трансформованих клітин до втрати своїх сконструйованих властивостей унаслідок змін або втрати плазмід. Ця проблема детально обговорюється в Zhang et al., (Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Advances*, Vol. 14, No. 4, pp. 401-435, 1996). Штами, трансформовані інтеграційними плазмідами, є високостабільними навіть за відсутності селективного тиску (Sherman, F. [http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman\\_f/yeast/9.html](http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/yeast/9.html) і див. Джерела інформації: в описі).

Гетерологічна ДНК зазвичай вводиться в організм у формі позахромосомних плазмід (YEр, YCp і YRp). На жаль, було встановлено як у випадку бактерій, так і дріжджів, що нові характеристики не можуть зберігатися, особливо за відсутності постійного селективного тиску. Причиною цього є нестабільність сегрегації гібридної плазміді, яка виникає, коли рекомбінантні клітини ростуть протягом тривалого періоду часу. Це веде до гетерогенності популяції і клональної варіабельності зрештою – до популяції клітин, в якій більшість клітин втратили свої властивості, отримані при трансформації. Якщо використовуються вектори з ауксотрофними маркерами, то культивування в збагачених середовищах часто призводить до швидкої втрати вектора, оскільки вектор утримується тільки в мінімальних середовищах. Альтернативний варіант з використанням домінуючих маркерів стійкості до антибіотиків часто не сумісний з виробничими процесами. Застосування антибіотиків може бути небажаним з погляду реєстрації (вірогідність того, що слідові кількості антибіотиків опиняться в кінцевому продукті) або із економічних причин (витрати на використання антибіотиків в промисловому масштабі).

Втрата векторів створює проблеми у великомасштабних виробничих ситуаціях. Існують і альтернативні методи введення ДНК в дріжджові клітини, такі як використання інтегруючих плазмід (YIp). ДНК інтегрується в геном хазяїна рекомбінацією, що приводить до високої стабільності. (Caunt, P. Stability of recombinant plasmids in yeast. *Journal of Biotechnology* 9(1988) 173 – 192). Авторами даного винаходу встановлено, що метод інтеграції, який використовує

транспозони хазяїна, є хорошою альтернативою.

#### Транспозони

У одному з варіантів здійснення винаходу клітина може містити більше від однієї копії бажаного гена (генів). Наприклад, два або більше гени ксилізомерази або генів ксилоредуктази і ксилітолдегідрогенази можуть інтегруватися в геном клітини для ферментації змішаних цукрів. Це може здійснюватися будь-яким методом, відомим з рівня техніки, який призводить до введення генів. У кращому варіанті це може здійснюватися за допомогою вектора, який містить частини, гомологічні до послідовностей (транспозон) клітини-хазяїна, які повторюються. Якщо клітина-хазяїн є дріжджовою клітиною, то відповідними послідовностями, що повторюються, є довгі кінцеві повтори (LTR) Ty-елемента, відомі як дельта-послідовність.

Елементи Ty підрозділяються на дві вельми схожих підродини, які називаються Ty1 і Ty2. Ці елементи мають довжину близько 6 тис. пар основ-нуклеотидів (т.п.н.) і пов'язані з довгими кінцевими повторами (LTR) – послідовностями, які містять близько 335 пар основ (Boeke JD et al., The *Saccharomyces cerevisiae* Genome Contains Functional and Nonfunctional Copies of Transposon Ty1. *Molecular and Cellular Biology*, Apr. 1988, p. 1432-1442 Vol. 8, No. 4). У штамі з повністю секвенованим геномом *S. cerevisiae* S288c транспозонами, які найчастіше зустрічаються є Ty1 (31 копія) і Ty2 (13 копій) (Gabriel A, Dapprich J, Kunkel M, Gresham D, Pratt SC, et al., (2006) Global mapping of transposon location. *PLoS Genet* 2(12): e212.doi:10.1371/journal.pgen.0020212). Ці транспозони складаються з двох відкритих рамок зчитування (ORF), які перекриваються і кожна з яких кодує декілька білків. Кодуючі області фланковані вищезазначеними приблизно ідентичними LTR. Інші більш несхожі Ty-елементи, які рідше зустрічаються в *S. cerevisiae*, включають Ty3, Ty4 і Ty5. Для кожної родини повнорозмірних Ty-елементів існує порядок величини крупніших solo-елементів LTR, розсіяних по геному. Передбачається, що вони утворюються в результаті LTR–LTR рекомбінації повнорозмірних елементів з випетлюванням внутрішніх областей, які кодують білки.

Механізм ретротранспозиції Ty-ретротранспозона використаний для інтеграції множинних копій по геному (Boeke et al., 1988; Jacobs et al., 1988). Довгі кінцеві повтори (LTR) Ty-елемента, відомі як дельта-послідовності, також є хорошими мішенями для інтеграції гомологічною рекомбінацією, оскільки вони зустрічаються приблизно в 150-200 копіях, які асоціюються або з Ty, або з solo-сайтами (Boeke, 1989; Kingsman and Kingsman, 1988). (Parekh R.N. (1996): An Integrating Vector for Tunable, High Copy, Stable Integration into the Dispersed Ty DELTA Sites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 1996, 12, 16-21).

#### Клітина-хазяїн

Клітина-хазяїн може бути будь-якою клітиною-хазяїном, придатною для отримання корисного продукту. Клітина винаходу може бути будь-якою придатною клітиною, такою як прокаріотична клітина, наприклад, бактерія, або еукаріотична клітина. У типових випадках клітина винаходу є еукаріотичною клітиною, наприклад, клітиною дріжджів або міцеліального гриба.

У контексті опису дріжджів визначаються як еукаріотичні мікроорганізми і включають всі види дріжджів підвідділу Eumycotina (Alexopoulos, C. J., 1962, In: *Introductory Mycology*, John Wiley & Sons, Inc., New York), які ростуть переважно в одноклітинній формі.

Дріжджі можуть рости або брунькуванням одноклітинного талому, або можуть рости діленням організму. Кращі дріжджі як клітини винаходу можуть відноситися до роду *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* або *Yarrowia*. Бажано дріжджами є дріжджі, здатні до анаеробної ферментації або до ферментації за умов обмеженої кількості кисню, краще – здатні до анаеробного спиртового бродіння.

У контексті опису міцеліальні гриби визначаються як еукаріотичні мікроорганізми, які включають всі міцеліальні форми підвідділу Eumycotina. Ці гриби характеризуються вегетативним міцелієм, який складається з хітину, целюлози і інших складних полісахаридів. Міцеліальні гриби, придатні для застосування як клітина даного винаходу, морфологічно, фізіологічно і генетично відрізняються від дріжджів. Можуть використовуватися переважно клітини міцеліальних грибів, оскільки більшість грибів не вимагає стерильних умов для розмноження і є несприйнятливими до інфікування бактеріофагом. Вегетативне зростання міцеліальних грибів відбувається за рахунок подовження гіфів, а вуглецевий катаболізм більшості міцеліальних грибів є облигатним аеробним. Кращі міцеліальні гриби як клітини-хазяїни за даним винаходом можуть відноситися до роду *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* або *Penicillium*. Краща клітина міцеліальних грибів може бути клітиною *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum* або клітиною *Rhizopus oryzae*.

У одному варіанті винаходу клітина-хазяїн може бути клітиною дріжджів.

Бажано клітина-хазяїн є промисловою клітиною-хазяїном, краще – промисловою дріжджовою клітиною. Промислову клітину-хазяїна і промислову дріжджову клітину можна визначити таким чином. Умови життя дріжджових клітин в промислових процесах істотно відрізняються від умов їх існування в лабораторії. Промислові дріжджові клітини повинні бути здатними добре працювати за багатьох умов зовнішнього середовища, які можуть варіювати в ході процесу. Таке варіювання включає зміни джерел поживних речовин, pH, концентрації етанолу, температури, концентрації кисню тощо, які в своїй сукупності потенційно впливають на зростання клітин і продукування етанолу дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*. У шкідливих промислових умовах толерантні до зовнішнього середовища штами повинні показувати інтенсивне зростання і продуктивність. В більшості випадків промислові штами дріжджів є стійкішими до вказаних змін умов зовнішнього середовища, які можуть відбуватися в місцях використання цих штамів, наприклад, в хлібопекарській промисловості, пивоварній промисловості, виноробстві і у виробництві етанолу. Прикладами промислових дріжджів (*S. cerevisiae*) є Ethanol Red® (Fermentis), Fermiol® (DSM) і Thermosacc® (Lallemend).

У одному з варіантів здійснення винаходу хазяїн є толерантним до інгібіторів. Толерантні до інгібіторів клітини-хазяїни можуть відбиратися шляхом скринінгу штамів на зростання на матеріалах, які містять інгібітори, такі як представлені в Kadar et al. у Appl. Biochem. Biotechnol. (2007), Vol. 136-140, 847-858, з яких був відібраний стійкий до інгібіторів штам *S. cerevisiae* ATCC 26602.

Бажано клітина-хазяїн є промисловою і стійкою до інгібіторів.

Гени *araA*, *araB* і *araD*

Клітина винаходу здатна утилізувати арабінозу. Отже, клітина винаходу здатна конвертувати L-арабінозу в L-рибулозу і/або ксилулозо-5-фосфат, і/або в бажаний продукт ферментації, наприклад, в один із згаданих в описі.

Організми, наприклад, штами *S. cerevisiae*, які здатні продукувати етанол з L-арабінози, можуть бути отримані модифікацією клітини шляхом введення до неї генів *araA* (L-арабінозоізомерази), *araB* (L-рибулокінази) і *araD* (L-рибулозо-5-P4-епімерази) з придатного джерела. Вказані гени можуть вводитися в клітину запропоновану винаходом для того, щоб надати їй здатності до утилізації арабінози. Такий підхід описаний в WO2003/095627. З цією метою можуть використовуватися гени *araA*, *araB* і *araD* з *Lactobacillus plantarum*, як описано в WO2008/041840. Також можуть використовуватися ген *araA* з *Bacillus subtilis* і гени *araB* і *araD* з *Escherichia coli*, як описано в EP1499708. У іншому варіанті здійснення винаходу гени *araA*, *araB* і *araD* можуть бути отримані, щонайменше, із одного з родів *Clavibacter*, *Arthrobacter* і/або *Gramella*, зокрема, одного з *Clavibacter michiganensis*, *Arthrobacter aureus* і/або *Gramella forsetii*, як описано в WO 2009011591.

PPP-гени

Клітина винаходу може містити одну або більше генетичних модифікацій, які збільшують метаболічний потік через пентозофосфатний шлях. Зокрема, генетична модифікація(ї) може(можуть) призводити до збільшеного потоку через неокислювальну частину пентозофосфатного шляху. У контексті опису під «генетичною модифікацією», що викликає збільшений потік через неокислювальну частину пентозофосфатного шляху, розуміють модифікацію, яка збільшує потік, щонайменше, приблизно в 1,1, приблизно в 1,2, приблизно в 1,5, приблизно в 2, приблизно в 5, приблизно в 10 або приблизно в 20 разів в порівнянні з потоком в штамі, який є генетично ідентичним, за винятком генетичної модифікації, яка викликає збільшений потік. Потік через неокислювальну частину пентозофосфатного шляху може бути визначений шляхом вирощування модифікованого хазяїна на ксилізі як єдиному джерелі вуглецю, визначення питомої швидкості споживання ксилізи і віднімання питомої швидкості продукування ксилітолу від питомої швидкості споживання ксилізи, якщо ксилітол взагалі продукується. Проте потік через неокислювальну частину пентозофосфатного шляху пропорційний швидкості росту на ксилізі як єдиному джерелі вуглецю, бажано – швидкості анаеробного росту на ксилізі як єдиному джерелі вуглецю. Існує лінійна залежність між швидкістю росту на ксилізі як єдиному джерелі вуглецю ( $\mu_{\max}$ ) і потоком через неокислювальну частину пентозофосфатного шляху. Питома швидкість споживання ксилізи ( $Q_s$ ) дорівнює швидкості росту ( $\mu$ ), розділеній на вихід біомаси на цукрі ( $Y_{xs}$ ), оскільки вихід біомаси на цукрі є постійною величиною (за заданої сукупності умов: анаеробний режим, поживне середовище, pH, генетичний фон штаму та ін. (тобто  $Q_s = \mu/Y_{xs}$ ). Таким чином, збільшений потік через неокислювальну частину пентозофосфатного шляху може бути виведений із збільшення максимальної швидкості росту за вказаних умов за відсутності транспорту (поглинання лімітоване).

Одна або більше генетичних модифікацій, які збільшують потік через пентозофосфатний шлях, можуть вводитися в клітину-хазяїна різними шляхами. Ці шляхи включають, наприклад, досягнення підвищених стійких рівнів активності ксилулозокінази і/або одного або більше ферментів неокислювальної частини пентозофосфатного шляху, і/або зниженого стійкого рівня активності неспецифічної альдозоредуктази. Вказані зміни стійких рівнів активності можуть бути викликані підбором мутантів (спонтанних або індукованих хімічними речовинами або радіацією) і/або методом рекомбінантних ДНК, наприклад, гіперекспресією або інактивацією відповідно генів, які кодують ферменти або фактори регуляції цих генів.

У кращій клітині-хазяїні генетична модифікація включає гіперекспресію, щонайменше, одного ферменту (неокислювальної частини) пентозофосфатного шляху. Бажано фермент вибирається з групи, яка складається з таких ферментів, як рибулозо-5-фосфатізомераза, рибулозо-5-фосфатепімераза, транскетолаза і трансальдолаза. Можлива гіперекспресія різних комбінацій ферментів (неокислювальної частини) пентозофосфатного шляху. Наприклад, ферментами, які здатні до гіперекспресуватися, можуть бути, щонайменше, ферменти рибулозо-5-фосфатізомераза і рибулозо-5-фосфатепімераза; або, щонайменше, ферменти рибулозо-5-фосфатізомераза і транскетолаза; або, щонайменше, ферменти рибулозо-5-фосфатізомераза і трансальдолаза; або, щонайменше, ферменти рибулозо-5-фосфатепімераза і транскетолаза; або, щонайменше, ферменти рибулозо-5-фосфатепімераза і трансальдолаза; або, щонайменше, ферменти транскетолаза і трансальдолаза; або, щонайменше, фермент рибулозо-5-фосфатепімераза, транскетолаза і трансальдолаза; або, щонайменше, ферменти рибулозо-5-фосфатізомераза, транскетолаза і трансальдолаза; або, щонайменше, ферменти рибулозо-5-фосфатізомераза, рибулозо-5-фосфатепімераза і трансальдолаза; або, щонайменше, ферменти рибулозо-5-фосфатізомераза, рибулозо-5-фосфатепімераза і транскетолаза. У одному варіанті здійснення винаходу кожен з ферментів – рибулозо-5-фосфатізомераза, рибулозо-5-фосфатепімераза, транскетолаза і трансальдолаза – гіперекспресується в клітині-хазяїні. Кращою є клітина-хазяїн, в якій генетична модифікація включає, щонайменше, гіперекспресію обох ферментів, – транскетолази і трансальдолази, оскільки така клітина-хазяїн вже здатна до анаеробного зростання на ксилізі. Фактично за деяких умов клітини-хазяїни, які гіперекспресують тільки транскетолазу і трансальдолазу, вже демонструють таку ж швидкість анаеробного росту на ксилізі, що і клітини-хазяїни, які гіперекспресують всі чотири ферменти, тобто рибулозо-5-фосфатізомеразу, рибулозо-5-фосфатепімеразу, транскетолазу і трансальдолазу. Більше того, клітини-хазяїни, які гіперекспресують обидва ферменти – рибулозо-5-фосфатізомеразу і рибулозо-5-фосфатепімеразу – є більш бажаними, ніж клітини-хазяїни, які гіперекспресують тільки ізомеразу або тільки епімеразу, оскільки гіперекспресія тільки одного з цих ферментів може призвести до метаболічного дисбалансу.

Фермент «рибулозо-5-фосфатепімераза» (ЄС 5.1.3.1) в контексті опису визначається як фермент, який каталізує епімеризацію D-ксилулозо-5-фосфату в D-рибулозо-5-фосфат і навпаки. Фермент відомий також як фосфорибулозоєпімераза; еритрозо-4-фосфатізомераза; фосфокетопентозо-3-епімераза; ксилулозофосфат-3-епімераза; фосфокетопентозоепімераза; рибулозо-5-фосфат-3-епімераза; D-рибулозофосфат-3-епімераза; D-рибулозо-5-фосфатепімераза; D-рибулозо-5-фосфат-3-епімераза; D-ксилулозо-5-фосфат-3-епімераза; пентозо-5-фосфат-3-епімераза або D-рибулозо-5-фосфат-3-епімераза. Рибулозо-5-фосфатепімераза може додатково визначатися її амінокислотною послідовністю. Так само, рибулозо-5-фосфатепімераза може визначатися послідовністю нуклеотидів, яка кодує фермент, а також послідовністю нуклеотидів, яка гібридизується з референс-послідовністю нуклеотидів, яка кодує рибулозо-5-фосфатепімеразу. Послідовність нуклеотидів, яка кодує рибулозо-5-фосфатепімеразу, позначена в описі як RPE1.

Фермент «рибулозо-5-фосфатізомераза» (ЄС 5.3.1.6) визначається в контексті опису як фермент, який каталізує пряму ізомеризацію D-рибозо-5-фосфату в D-рибулозо-5-фосфат і навпаки. Фермент відомий також як фосфопентозоізомераза; фосфорибоізомераза; рибозофосфатізомераза; 5-фосфорибоізомераза; D-рибозо-5-фосфатізомераза; D-рибозо-5-фосфат-кетол-ізомераза або D-рибозо-5-фосфат-альдозо-кетозоізомераза. Рибулозо-5-фосфатізомераза може додатково визначатися своєю амінокислотною послідовністю. Так само, рибулозо-5-фосфатізомераза може визначатися послідовністю нуклеотидів, яка кодує фермент, а також послідовністю нуклеотидів, яка гібридизується з референсною послідовністю нуклеотидів, яка кодує рибулозо-5-фосфатізомеразу. Послідовність нуклеотидів, яка кодує рибулозо-5-фосфатізомеразу, позначена в описі як RKI1.

Фермент «транскетолаза» (ЄС 2.2.1.1) визначається в контексті опису як фермент, який каталізує реакцію: D-рибозо-5-фосфат + D-ксилулозо-5-фосфат <-> седогептулозо-7-фосфат +

D-гліцеральдегід-3-фосфат і навпаки. Фермент відомий також як глікольальдегідтрансфераза або седогептулозо-7-фосфат:D-гліцеральдегід-3-фосфат-глікольальдегідтрансфераза. Транскетолаза може також визначатися своєю амінокислотною послідовністю. Так само, транскетолаза може визначатися послідовністю нуклеотидів, яка кодує фермент, а також послідовністю нуклеотидів, яка гібридизується з референсною послідовністю нуклеотидів, яка кодує транскетолазу. Послідовність нуклеотидів, яка кодує транскетолазу, позначена в описі як TKL1.

Фермент «трансальдолаза» (EC 2.2.1.2) визначається в контексті опису як фермент, який каталізує реакцію: седогептулозо-7-фосфат + D-гліцеральдегід-3-фосфат  $\leftrightarrow$  D-еритрозо-4-фосфат + D-фруктозо-6-фосфат і навпаки. Фермент відомий також як дигідроксиацетонтрансфераза; дигідроксиацетонсинтаза; формальдегідтранскетолаза або седогептулозо-7-фосфат:D-гліцеральдегід-3-фосфат- гліцеронтрансфераза. Трансальдолаза може також визначатися своєю амінокислотною послідовністю. Так само, трансальдолаза може визначатися послідовністю нуклеотидів, яка кодує фермент, а також послідовністю нуклеотидів, яка гібридизується з референсною послідовністю нуклеотидів, яка кодує трансальдолазу. Послідовність нуклеотидів, яка кодує трансальдолазу, позначена в описі як TAL1.

Гени ксилоізомерази або ксилоредуктази і ксилітолдегідрогенази

Відповідно до винаходу одна, дві або більше копій одного або більше генів ксилоізомерази і/або одного або більше генів ксилоредуктази і ксилітолдегідрогенази вводяться в геном клітини-хазяїна. Присутність цих двох або більше генетичних елементів надає клітині здатності до конверсії ксилози ізомеризацією або відновленням.

У одному варіанті здійснення винаходу одна, дві або більше копії одного або більше генів ксилоізомерази вводяться в геном клітини-хазяїна.

«Ксилоізомераза» (EC 5.3.1.5) в контексті опису визначається як фермент, який каталізує пряму ізомеризацію D-ксилози в D-ксилозу і/або навпаки. Фермент відомий також як D-ксілозокетозізомераза. Ксилоізомераза в контексті винаходу може бути також здатною каталізувати конверсію між D-глюкозою і D-фруктозою (і тому може бути віднесена відповідно до глюкозоізомерази). Ксилоізомераза в контексті винаходу може вимагати присутності двовалентного катіона, такого як магній, марганець або кобальт, як кофактора.

Таким чином, така клітина для ферментації змішаних цукрів здатна до ізомеризації ксилози в ксилулозу. Здатність до ізомеризації ксилози в ксилулозу надається клітині-хазяїну трансформацією клітини-хазяїна нуклеїнокислотним конструктом, який містить послідовність нуклеотидів, яка кодує певну ксилоізомеразу. Клітина для ферментації змішаних цукрів ізомеризує ксилулозу в ксилулозу прямою ізомеризацією ксилози в ксилулозу.

Одиницю (U) ксилоізомеразної активності в контексті опису можна визначити як кількість ферменту, яка продукує 1 нмоль ксилулози за хвилину за умов, описаних в Kuypers et al. (2003, FEMS Yeast Res. 4: 69-78). Ген ксилоізомерази може мати різне походження, наприклад, з *Ryomycetes* sp., як описано в WO2006/009434. Інші придатними джерелами походження є *Bacteroides*, зокрема, *Bacteroides uniformis*, як описано в PCT/EP2009/52623; *Bacillus*, зокрема, *Bacillus stearothermophilus*, як описано в PCT/EP2009/052625.

У іншому варіанті здійснення винаходу дві або більше копії одного або більше генів ксилоредуктази і ксилітолдегідрогенази вводяться в геном клітини-хазяїна. У цьому варіанті конверсія ксилози здійснюється як двохстадійна конверсія ксилози в ксилулозу з утворенням ксилітолу як проміжного продукту, причому стадії конверсії каталізують відповідно ксилоредуктазою і ксилітолдегідрогеназою. У одному з варіантів ксилоредуктаза (XR), ксилітолдегідрогеназа (XDH) і ксилокіназа (XK) можуть гіперекспресуватися, і необов'язково має місце активація одного або більше генів, які кодують ферменти, які продукують NADPH (НАДФ = никотинамідаденіндинуклеотидфосфат), і одного або більше генів, які кодують ферменти, що споживають NADH (никотинамідаденіндинуклеотид, відновлена форма), як описано в WO 2004085627.

Ген XKS1

Клітина винаходу може мати одну або більше генетичних модифікацій, які підвищують питому ксилулозокіназну активність. Бажано генетична модифікація або модифікації викликають гіперекспресію ксилулозокінази, наприклад, в результаті гіперекспресії послідовності нуклеотидів, яка кодує ксилулозокіназу. Ген, який кодує ксилулозокіназу, може бути ендегенним по відношенню до клітини-хазяїна або ксилулозокіназа може бути гетерологічною до клітини-хазяїна. Послідовність нуклеотидів, яка використовується для гіперекспресії ксилулозокінази в клітині-хазяїні запропонований винаходом, є послідовність нуклеотидів, яка кодує поліпептид з ксилулозокіназною активністю.

Фермент «ксилулозокіназа» (EC 2.7.1.17) в контексті опису визначається як фермент, який



каталізує реакцію: АТФ + D-ксилоза = АДФ + D-ксилозо-5-фосфат. Фермент відомий також як фосфорилуюча ксилулокіназа, D-ксилокіназа або АТФ:D-ксилозо-5-фосфотрансфераза. Ксилулокіназа винаходу може також визначатися своєю амінокислотною послідовністю. Так само, ксилулокіназа може визначатися послідовністю нуклеотидів, яка кодує фермент, а також послідовністю нуклеотидів, яка гібридується з референсною послідовністю нуклеотидів, яка кодує ксилулокіназу.

У клітині запропонованій винаходом генетична модифікація або модифікації, яка(i) підвищує(ють) питому ксилулокіназну активність, може(можуть) комбінуватися з будь-якою з модифікацій, які збільшують потік через пентозофосфатний шлях, як описано вище. Проте це не істотно.

Таким чином, клітина-хазяїн запропонована винаходом може містити тільки генетичну модифікацію або модифікації, яка(i) підвищує(ють) питому ксилулокіназну активність. Відомі з рівня техніка різні методи для досягнення і аналізу гіперекспресії ксилулокінази в клітинах-хазяїнах відповідно до винаходу аналогічні до методів, описаних вище стосовно ферментів пентозофосфатного шляху. Бажано в клітинах-хазяїнах запропонованих винаходом, ксилулокіназа, яка піддається гіперекспресії гіперекспресується щонайменше, приблизно в 1,1, приблизно в 1,2, приблизно в 1,5, приблизно в 2, приблизно в 5, приблизно в 10 або приблизно в 20 разів у порівнянні з штамом, який є генетично ідентичним, за винятком генетичної модифікації(й), що викликає(ють) гіперекспресію. Саме собою зрозуміло, що вказані рівні гіперекспресії можуть бути застосовними і до стійкого рівня ферментної активності, стійкого рівня ферментного білка, а також до стійкого рівня транскрипту, який кодує фермент.

Делеція гена альдозоредуктази (GRE3)

У варіанті здійснення винаходу, в якому ХІ використовується як ген конверсії ксилози, він здатний бажано знижувати активність альдозоредуктази. Тому клітина запропонована винаходом може містити одну або більше генетичних модифікацій, яка(i) знижує(ють) неспецифічну альдозоредуктазну активність в клітині-хазяїні. Бажано неспецифічна альдозоредуктазна активність в клітині-хазяїні знижується в результаті однієї або більше генетичних модифікацій, які знижують експресію або інактивують ген, який кодує неспецифічну альдозоредуктазу. Бажано генетична модифікація(iii) знижують або інактивують експресію кожної ендогенної копії гена, що кодує неспецифічну альдозоредуктазу в клітині-хазяїні (у описі це названо делецією GRE3). Клітини-хазяїни можуть містити множинні копії генів, що кодують неспецифічні альдозоредуктази як результат ди-, полі- або анеуплоїдії, і/або клітина-хазяїн може містити декілька різних (ізо)ферментів з альдозоредуктазною активністю, які розрізняються амінокислотною послідовністю і кожен з яких кодується різними генами. І в цих випадках бажано експресія кожного гена, який кодує неспецифічну альдозоредуктазу, знижується або інактивується. Бажано ген інактивується в результаті делеції, щонайменше, частини гена або в результаті руйнування гена, тому в даному контексті термін «ген» включає будь-яку не кодуючу послідовність справа або зліва від кодуючої послідовності, (часткова) делеція або інактивація якої призводить до зниження експресії неспецифічної альдозоредуктазної активності в клітині-хазяїні.

Послідовність нуклеотидів, яка кодує альдозоредуктазу, активність якої може знижуватися в клітині-хазяїні запропонованій винаходом, є послідовністю нуклеотидів, яка кодує поліпептид з альдозоредуктазною активністю.

Тому клітина-хазяїн запропонована винаходом, яка містить тільки генетичну модифікацію або модифікації, яка(i) знижує(ють) неспецифічну альдозоредуктазну активність в клітині-хазяїні, спеціально включена до складу винаходу.

Фермент «альдозоредуктаза» (ЄС 1.1.1.21) в контексті опису визначається як фермент, який здатний відновлювати ксилозу або ксилулозу до ксилітолу (ксиліту). В контексті даного винаходу альдозоредуктаза може бути будь-якою неспецифічною альдозоредуктазою, яка є нативною (ендогенною) щодо клітини-хазяїна запропонованої винаходом і яка здатна відновлювати ксилозу або ксилулозу до ксилітолу (ксиліту). Неспецифічні альдозоредуктази каталізують реакцію: альдоза + NAD(P)H + H<sup>+</sup> - альдитол (альдит) + NAD(P)<sup>+</sup> (окислена форма НАДФ).

Фермент проявляє широкий спектр специфічності і відомий також як альдозоредуктаза; поліолдегідрогеназа (NADP<sup>+</sup>); алдитол:NADP-оксидоредуктаза; алдитол:NADP<sup>+</sup>-1-оксидоредуктаза; NADPH-альдопентозоредуктаза або NADPH-альдозоредуктаза.

Конкретний приклад такої неспецифічної альдозоредуктази, яка є ендогенною щодо *S. cerevisiae* і яка кодується геном GRE3, див. Traff et al., 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 5668-74. Таким чином, альдозоредуктаза запропонована винаходом може також визначатися своєю амінокислотною послідовністю. Так само, альдозоредуктаза може визначатися послідовностями

нуклеотидів, які кодують фермент, а також послідовністю нуклеотидів, яка гібридизується з референсною послідовністю нуклеотидів, яка кодує альдозоредуктазу.

Ідентичність послідовностей

Ідентичність послідовностей (або схожість послідовностей) в контексті опису визначається як «відповідність» між двома або більше амінокислотними (поліпептид або білок) послідовностями або між двома або більше нуклеїнокислотними (полінуклеотиди) послідовностями, яка визначається шляхом порівняння послідовностей. Зазвичай ідентичність або схожість послідовностей порівнюється в типових випадках за всією довжиною порівнюваних послідовностей. Проте послідовності можуть порівнюватися і за коротшими вікнами порівняння. У рівні техніки «ідентичність» означає також ступінь спорідненості між амінокислотними або нуклеїнокислотними послідовностями, яка визначається в деяких випадках за збігами між нитками таких послідовностей.

Розроблені кращі методи визначення ідентичності з виявленням максимальної кількості збігів між аналізованими послідовностями. Методи визначення ідентичності і схожості кодифікують в вільно-доступних комп'ютерних програмах. Кращі методи визначення ідентичності і схожості між двома послідовностями з використанням комп'ютерних програм включають, наприклад, BestFit, BLASTP, BLASTN і FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), вільно-доступні з NCBI та інших джерел (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894). Кращими параметрами порівняння амінокислотних послідовностей за допомогою BLASTP є: штраф за відкриття пропуску 11,0, штраф за продовження пропуску 1, матриця Blosom 62. Кращими параметрами порівняння нуклеїнокислотних послідовностей за допомогою BLASTP є: штраф за відкриття пропуску 11,0, штраф за продовження пропуску 1, повнорозмірна ДНК-матриця (матриця ідентичності ДНК).

Необов'язково при визначенні ступеня амінокислотної схожості кваліфікований фахівець може також брати до уваги так звані «консервативні» амінокислотні заміни, що стане зрозумілим в ході визначення.

Консервативні амінокислотні заміни відносяться до взаємозамінюваності залишків, які мають схожі бічні ланцюги. Наприклад, група амінокислот, які мають аліфатичні бічні ланцюги, включає гліцин, аланін, валін, лейцин та ізолейцин; група амінокислот, які мають аліфатичні-гідроксильні, бічні ланцюги, включає серин і треонін; група амінокислот, які мають амідовмісні бічні ланцюги, включає аспарагін і глутамін; група амінокислот, які мають ароматичні бічні ланцюги, включає фенілаланін, тирозин і триптофан; група амінокислот, які мають основні бічні ланцюги, включає лізин, аргінін і гістидин, і група амінокислот, які мають сірковмісні бічні ланцюги, включає цистеїн і метіонін.

Кращими групами консервативних амінокислотних замінів є: валін-лейцин-ізолейцин, фенілаланін-тирозин, лізин-аргінін, аланін-валін і аспарагін-глутамін. Варіантами замінів в описаних тут амінокислотних послідовностях є такі варіанти, в яких, щонайменше, один залишок видалений з описаних послідовностей, а інший залишок, який відрізняється від видаленого, інсерцируваний на його місце. Бажано амінокислотна заміна є консервативною. Кращими консервативними замінами для кожної з амінокислот, які зустрічаються в природі, є наступні: Ala > ser; Arg > lys; Asn > gln або his; Asp > glu; Cys > ser або ala; Gln > asn; Glu > asp; Gly > pro; His > asn або gln; Ile > leu або val; Leu > ile або val; Lys > arg, gln або glu; Met > leu або ile; Phe > met, leu або tyr; Ser > thr; Thr > ser; Trp > tyr; Tyr > trp або phe і Val > ile або leu.

Жорсткі умови гібридизації в контексті опису визначаються як умови, які роблять можливою гібридизацію нуклеїнокислотної послідовності, яка складається з, щонайменше, приблизно 25, краще – з приблизно 50, 75 або 100 нуклеотидів і найкраще – з приблизно 200 або більше нуклеотидів, за температури біля 65 °C в розчині, який містить приблизно 1 М солі, бажано 6 × SSC (хлорид натрію, цитрат натрію), або в будь-якому іншому розчині з співрозмірною іонною силою і відмивання при 65 °C в розчині, який містить приблизно 0,1 М солі або менше, бажано – 0,2 × SSC, або в будь-якому іншому розчині з співрозмірною іонною силою. Бажано гібридизація здійснюється протягом ночі, тобто протягом, щонайменше, 10 годин, а відмивання бажано проводиться протягом, щонайменше, однієї години, щонайменше, з двома замінами промивального розчину. Ці умови зазвичай є придатними для специфічної гібридизації послідовностей із ступенем ідентичності приблизно 90% або вище.

Помірні умови в контексті опису визначаються як умови, які роблять можливою гібридизацію нуклеїнокислотних послідовностей, які складаються з, щонайменше, 50 нуклеотидів, краще – з приблизно 200 або більше нуклеотидів, за температури біля 45 °C в розчині, який містить приблизно 1 М солі, бажано 6 × SSC, або в будь-якому іншому розчині з співрозмірною іонною силою і відмивання за кімнатної температури в розчині, який містить приблизно 1 М солі, бажано – 6 × SSC, або в будь-якому іншому розчині з співрозмірною іонною силою. Бажано

гібридизація здійснюється протягом ночі, тобто протягом, щонайменше, 10 годин, а відмивання, бажано, проводиться протягом, щонайменше, однієї години, щонайменше, з двома замінами промивального розчину. Ці умови зазвичай є придатними для специфічної гібридизації послідовностей із ступенем ідентичності до 50%. Фахівець, кваліфікований в даній галузі

5 техніки, може самостійно модифікувати вказані умови гібридизації для специфічної ідентифікації послідовностей із ступенем ідентичності від 50% до 90%.

Щоб збільшити вірогідність того, що введений фермент експресується в активній формі в клітині запропоновані винаходом, можна адаптувати відповідну кодуючу послідовність нуклеотидів для оптимізації частоти використання її кодонів наблизивши її до частоти використання кодонів відібраної дріжджової клітини. У рівні техніки відомо декілька методів оптимізації кодонів. Кращим методом оптимізації частоти використання кодонів нуклеотидних послідовностей до частоти використання кодонів дріжджів є метод оптимізації пар кодонів, описаний в WO2006/077258 і/або WO2008/000632. WO2008/000632 відноситься до оптимізації пар кодонів. Оптимізація пар кодонів – це метод, в якому послідовності нуклеотидів, які кодують поліпептид, модифікуються за частотою використання кодонів, зокрема, за частотою використання пар кодонів, для досягнення покращеної експресії послідовності нуклеотидів, яка кодує поліпептид, і/або покращеного продукування кодованого поліпептиду. Пари кодонів визначаються як набір з двох послідовних триплетів (кодонів) в кодуючій послідовності.

Індекс адаптації кодонів (CAI) використовується у винаході як проста міра експресії генів і ефективності трансляції, як описано в Xuhua Xia, *Evolutionary Bioinformatics* 2007: 3, 53-58. Індекс використовує стандартний набір вискоекспресованих генів з одного виду для оцінки відносних показників кожного кодону, а оцінка у балах для гена розраховується, виходячи з частоти використання всіх кодонів в цьому гені. Індекс оцінює той ступінь, при якому відбір показав свою ефективність у формуванні патерну частоти використання кодонів. У зв'язку з цим, він може бути корисним для прогнозування рівня експресії гена, для оцінки адаптації вірусних генів до їх хазяїв і для проведення порівняльної оцінки частоти використання кодонів в різних організмах. Індекс може також дати наближену оцінку ймовірності ефективності гетерологічної експресії гена. У генах з оптимізованою парою кодонів згідно винаходу CAI складає 0,6 або вище, 0,7 або вище, 0,8 або вище, 0,85 або вище, 0,87 або вище, 0,90 або

30 вище, 0,95 або вище або близько 1,0. Таким чином, клітина запропонована винаходом є клітиною, яка містить, тобто була трансформована ним, нуклеїнокислотний конструкт, який містить послідовність нуклеотидів, яка кодує гени *araA*, *araB* і *araD*, як вказано вище. Нуклеїнокислотний конструкт, який містить послідовність, яка кодує *araA*, бажано здатний експресувати гени *araA* в клітині-хазяїні.

35 Бажано гени експресуються в цитозолі. Експресія в цитозолі може досягатися в результаті делеції або модифікації мітохондріального або пероксисомального цільового сигналу.

Виробництво біопродуктів

Протягом багатьох років виносилися на обговорення пропозиції про інтродукцію різних організмів для виробництва біоетанолу з цукрів сільськогосподарських культур. Проте на практиці у всіх основних способах виробництва етанолу як продуцент етанолу продовжували використовувати дріжджі роду *Saccharomyces*. Це пояснюється багатьма привабливими властивостями дріжджів виду *Saccharomyces* для промислових процесів, тобто їх високою стійкістю до кислот і етанолу, високою осмоотолерантністю, здатністю до анаеробного зростання і, зрозуміло, їх високою здатністю до спиртового бродіння. Кращими видами дріжджів, які

45 можуть бути клітинами-хазяїнами, є *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* або *K. fragilis*. Клітина запропонована винаходом може бути здатною до конверсії рослинної біомаси, целюлози, геміцелюлоз, пектинів, рамнози, галактози, фруктози, мальтози, мальтодекстринів, рибози, рибулози або крохмалю, похідних крохмалю, сахарози, лактози і гліцерину, наприклад, у ферментовані цукри. Відповідно клітина запропонована винаходом може експресувати один або більше ферментів, таких як целюлаза (ендоцелюлаза або екзоцелюлаза); геміцелюлаза (ендо- або екзоксиланаза або арабіназа), необхідних для конверсії целюлози в мономери глюкози, а геміцелюлози – в мономери ксилози і арабінози; пектиназа, здатна перетворювати пектини на глюкуронову кислоту і галактуонову кислоту, або амілаза, яка перетворює крохмаль на мономери глюкози.

50 Крім того, клітина бажано проявляє ферментативну активність, потрібну для конверсії пірувату в бажаний продукт ферментації, такий як етанол, бутанол, молочна кислота, 3-гідроксипропіонова кислота, акрилова кислота, оцтова кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, фумарова кислота, яблучна кислота, ітаконова кислота, амінокислота, 1,3-пропандіол, 60 етилен, гліцерин,  $\beta$ -лактаміний антибіотик або цефалоспорин.

Кращою клітиною запропонованою винаходом є клітина, здатна за своєю природою до спиртового бродіння, бажано – до анаеробного спиртового бродіння. Клітина запропонована винаходом бажано характеризується високою стійкістю до етанолу, високою стійкістю до низького рН (тобто вона здатна до зростання при рН нижче приблизно 5, приблизно 4, приблизно 3 або приблизно 2,5) і до органічних кислот, таких як молочна кислота, оцтова кислота або мурашина кислота, і/або до продуктів розпаду цукрів, таких як фурфурол і гідроксиметилфурфурол, і/або високою стійкістю до підвищених температур.

Будь-яка з вищеперелічених характеристик або активностей клітини запропонованої винаходом може бути присутньою в клітині від природи або може бути введена в неї або модифікована шляхом генетичної модифікації.

Клітина запропонована винаходом може бути клітиною, придатною для отримання етанолу. Проте клітина запропонована винаходом може бути придатна і для отримання інших, крім етанолу, продуктів ферментації. Такі «не етанольні» продукти ферментації включають, в принципі, будь-яку з низьким ступенем чистоти або високочисту хімічну речовину, яка продукується еукаріотичним мікроорганізмом, таким як дріжджі або міцеліальний гриб.

Такими продуктами ферментації можуть бути, наприклад, бутанол, молочна кислота, 3-гідроксипропіонова кислота, акрилова кислота, оцтова кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, яблучна кислота, фумарова кислота, ітаконова кислота, амінокислота, 1,3-пропандіол, етилен, гліцерин, β-лактамний антибіотик або цефалоспорин. Краща клітина запропонована винаходом для отримання «не етанольних» продуктів ферментації є клітиною-хазяїном, яка містить генетичну модифікацію, що призводить до зниження алкогольдегідрогеназної активності.

У наступному аспекті винахід відноситься до способів ферментації, в яких клітини запропоновані винаходом використовуються для ферментації джерела вуглецю, включаючи джерело ксилози, таке як ксилоза. На додачу до джерела ксилози джерело вуглецю в середовищі ферментації може також включати джерело глюкози. Джерело ксилози або глюкози може бути чистою ксилозою або чистою глюкозою або може бути будь-яким вуглеводневим - оліго- або полімером, який містить одиниці ксилози або глюкози, таким як, наприклад, лігноцелюлоза, ксилани, целюлоза, крохмаль тощо. Для вивільнення одиниць ксилози або глюкози з таких вуглеводів відповідна карбогідраза (такі як ксиланаз, глюканаз, амілази та ін.) може додаватися до середовища ферментації або можуть продукуватися самою клітиною. У останньому випадку клітина може сконструйована шляхом генної інженерії з наданням їй здатності до продукування і виділення такої карбогідрази. Додаткова перевага від використання оліго- або полімерних джерел глюкози полягає в тому, що це робить можливою підтримку низької(зниженої) концентрації вільної глюкози в процесі ферментації, наприклад, за рахунок використання карбогідрази в кількостях, які обмежують швидкість. А це, у свою чергу, перешкоджатиме репресії систем, необхідних для метаболізму і транспорту інших цукрів (не глюкози), таких як ксилоза.

У кращому способі клітина ферментує і ксилозу, і глюкозу, бажано одночасно; в цьому випадку бажано використовується клітина, яка є нечутливою до репресії глюкози, щоб уникнути дивакування росту. На додачу до джерела ксилози (і глюкози) як джерело вуглецю середовище ферментації може містити також відповідний інгредієнт, потрібний для росту клітини. Склад середовищ ферментацій для зростання мікроорганізмів, таких як дріжджі, добре відомий в рівні техніки. Спосіб ферментації – це спосіб отримання продукту ферментації, такого як, наприклад, етанол, бутанол, молочна кислота, 3-гідроксипропіонова кислота, акрилова кислота, оцтова кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, яблучна кислота, фумарова кислота, ітаконова кислота, амінокислота, 1,3-пропандіол, етилен, гліцерин, β-лактамний антибіотик, такий як Пеніцилін G або Пеніцилін V і їх ферментативні похідні, і цефалоспорин.

#### Лігноцелюлоза

Лігноцелюлоза, яку можна розглядати як потенційно поновлювану промислову сировину, в більшості випадків містить полісахариди – целюлозу (глюкани) і геміцелюлози (ксилани, гетероксилани і ксилоглюкани). Додатково деякі геміцелюлози можуть бути присутніми у формі глюкомананів, наприклад, в деревній сировині. Ферментативний гідроліз цих полісахаридів до розчинних цукрів, включаючи як мономер, так і мультимери, наприклад, глюкозу, целобіозу, ксилозу, арабінозу, галактозу, фруктозу, манозу, рамнозу, рибозу, галактуранову кислоту, глюкуронову кислоту та інші гексози і пентози, відбувається під дією різних ферментів, які діють в сукупності.

До того ж, пектини і інші пектинові речовини, такі як арабінани, можуть складати значну частку сухої маси стінок типових клітин з недеревних рослинних тканин (пектини можуть складати приблизно від 1/4 до половини сухої маси).

### Передобробка

Передобробка може бути бажаною за необхідності виділення цукрів, здатних ферментуватися згідно винаходу, з лігноцелюлозного (включаючи геміцелюлозний) матеріалу. Ця стадія може здійснюватися традиційними способами, таким як, наприклад

#### 5 Ферментативний гідроліз

Ферментативний гідроліз може проводитися традиційними способами.

#### Ферментація

Спосіб ферментації може бути аеробним або анаеробним способом ферментації. Анаеробний спосіб ферментації в контексті опису визначається як спосіб ферментації, який протікає за відсутності кисню, або як спосіб, в якому кисень в основному не споживається або споживається в кількості бажано менше приблизно 5, приблизно 2,5 або приблизно 1 ммол/л/год., краще – 0 ммол/л/год. (тобто споживання кисню неможливо виявити), і в якому органічні молекули служать і донорами, і акцепторами електронів. За відсутності кисню NADH (відновлена форма никотинамідаденіндинуклеотиду), який утворюється в процесі гліколізу і утворення біомаси, не здатний окислюватися окислювальним фосфорилуванням. Щоб вирішити цю проблему, багато мікроорганізмів використовують піруват або одну з його похідних як акцептор електронів і водню, регенеруючи, тим самим, NAD<sup>+</sup> (окислена форма никотинамідаденіндинуклеотиду).

Таким чином, в кращому анаеробному способі ферментації піруват використовується як акцептор електронів (і водню) і відновлюється до продуктів ферментації, таких як етанол, бутанол, молочна кислота, 3-гідроксипропіонова кислота, акрилова кислота, оцтова кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, яблучна кислота, фумарова кислота, амінокислота, 1,3-пропандіол, етилен, гліцерин, β-лактамний антибіотик або цефалоспорин.

Спосіб ферментації бажано протікає за температури, яка є оптимальною для клітини. Отже, при використанні клітин-хазяїнів більшості дріжджів або міцеліальних грибів спосіб ферментації проводиться за температури нижче приблизно 42 °C, бажано – нижче приблизно 38 °C. У випадку клітин-хазяїнів дріжджів або міцеліального гриба спосіб ферментації проводиться за температури нижче приблизно 35 °C, приблизно 33 °C, приблизно 30 °C або приблизно 28 °C і за температури вищої від приблизно 20 °C, приблизно 22 °C або приблизно 25 °C.

Вихід етанолу на ксилозі і/або глюкозі в способі бажано складає, щонайменше, близько 50%, близько 60%, близько 70%, близько 80%, близько 90%, близько 95% або близько 98%. У контексті опису вихід етанолу визначається як відсоток від теоретичного максимального виходу.

Винахід відноситься також до способу отримання продукту ферментації.

Способи ферментації можуть проводитися в періодичному, періодичному з підживленням або безперервному режимі. Він може також здійснюватися в режимі роздільного проведення процесів гідролізу і ферментації (SHF-спосіб) або в режимі одночасного проведення процесів зцукрення (цукроутворення) і ферментації (SSF-спосіб). Можлива також комбінація вказаних режимів способу ферментації для досягнення оптимальної продуктивності.

Спосіб ферментації за даним винаходом може протікати в аеробних і анаеробних умовах. Бажано спосіб проводиться за мікроаерофільних умов або за умов обмеженої кількості кисню.

Анаеробний спосіб ферментації в контексті опису визначається як спосіб ферментації, який протікає за відсутності кисню, або як спосіб, в якому кисень в основному не споживається або спожита кількість кисню бажано складає менше приблизно 5, приблизно 2,5 або приблизно 1 ммол/л/год. і в якому органічні молекули служать і донорами, і акцепторами електронів.

Спосіб ферментації в умовах обмеженої кількості кисню – це спосіб, в якому споживання кисню обмежене перенесенням кисню з газу в рідину. Ступінь обмеження кисню визначається кількістю і складом вхідного газового потоку, а також фактичними показниками змішування/масопереносу у використовуваному устаткуванні ферментації. Бажано в способі за умов обмеженої кількості кисню швидкість споживання кисню становить, щонайменше, близько 5,5, краще, щонайменше, близько 6, наприклад, щонайменше 7 ммол/м/год. Спосіб запропонований винаходом передбачає вилучення продукту ферментації.

У кращому варіанті способу клітина ферментує як ксилозу, так і глюкозу, бажано одночасно, тому в цьому випадку бажано використовується клітина, яка є нечутливою до репресії глюкози, щоб уникнути дивакувального зростання. На додачу до джерела ксилози (і глюкози) як джерело вуглецю середовище ферментації містить також відповідний інгредієнт, необхідний для зростання клітини. Склади середовищ ферментацій для зростання мікроорганізмів, таких як дріжджі, добре відомі з рівня техніки.

Спосіб ферментації може здійснюватися в періодичному, періодичному з підживленням або безперервному режимі. Він може також здійснюватися в режимі роздільного проведення процесів гідролізу і ферментації (SHF-спосіб) або в режимі одночасного проведення процесів

зцукрення (цукроутворення) і ферментації (SSF-спосіб). Можлива також комбінація вказаних режимів способу ферментації для досягнення оптимальної продуктивності. Детальніше вищезгадані способи описані нижче.

#### SSF-режим

У випадку режиму з одночасним проведенням процесів цукроутворення і ферментації (SSF) час реакції на стадії розрідження/гідролізу або на стадії попереднього цукроутворення залежить від часу реалізації бажаного виходу, тобто виходу від конверсії целюлози в глюкозу. Цей вихід бажано є високим, наскільки це можливо, і бажано складає 60% або вище, 65% або вище, 70% або вище, 75% або вище, 80% або вище, 85% або вище, 90% або вище, 95% або вище, 96% або вище, 97% або вище, 98% або вище, 99% або вище, навіть 99,5% або вище або 99,9% або вище.

Згідно винаходу досягаються дуже високі концентрації цукрів в SHF-режимі і дуже високі концентрації продукту (наприклад, етанолу) в SSF-режимі. У SHF-режимі концентрація глюкози складає 25 г/л або більше, 30 г/л або більше, 35 г/л або більше, 40 г/л або більше, 45 г/л або більше, 50 г/л або більше, 55 г/л або більше, 60 г/л або більше, 65 г/л або більше, 70 г/л або більше, 75 г/л або більше, 80 г/л або більше, 85 г/л або більше, 90 г/л або більше, 95 г/л або більше, 100 г/л або більше, 110 г/л або більше, 120 г/л або більше, або може складати, наприклад, від 25 г/л до 250 г/л, від 30 г/л до 200 г/л, від 40 г/л до 200 г/л, від 50 г/л до 200 г/л, від 60 г/л до 200 г/л, від 70 г/л до 200 г/л, від 80 г/л до 200 г/л, 90 г/л, від 80 г/л до 200 г/л.

Концентрація продукту в SSF-режимі

У SSF-режимі концентрація продукту (г/л) залежить від кількості глюкози, що утворилася, але це практично не можна побачити, оскільки цукри конвертуються в продукт в SSF-режимі, і концентрації продукту можна пов'язати з відповідною концентрацією глюкози, лише помноживши на теоретичний максимальний вихід ( $Y_{ps_{max}}$  в грамах продукту на грам глюкози).

Теоретичний максимальний вихід ( $Y_{ps_{max}}$  в грамах продукту на грам глюкози) продукту ферментації можна знайти в підручнику з біохімії. У випадку етанолу 1 моль глюкози (180 г) за умов нормального протікання ферментативного гліколізу в дріжджах дає 2 моля етанолу ( $=2 \times 46 = 92$  г етанолу). Тому теоретичний максимальний вихід етанолу на глюкозі складає  $92/180 = 0,511$  г етанолу/г глюкози.

У випадку бутанолу (ММ 74 г/моль) або ізобутанолу теоретичний максимальний вихід складає 1 моль бутанолу на моль глюкози. Тому  $Y_{ps_{max}}$  для (з) бутанолу  $= 74/180 = 0,411$  г (з) бутанолу/г глюкози.

Для молочної кислоти вихід при гомоферментативному молочнокислому бродінні складає 2 моля молочної кислоти (ММ = 90 г/моль) на моль глюкози. Відповідно до цієї стехіометрії,  $Y_{ps_{max}} = 1$  г молочної кислоти/г глюкози.

Аналогічні розрахунки можуть бути проведені і для інших продуктів ферментації.

#### SSF-режим

У SSF-режимі концентрація продукту складає  $25 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $30 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $35 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $40 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $45 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $50 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $55 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $60 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $65 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $70 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $75 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $80 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $85 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $90 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $95 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $100 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $110 \cdot Y_{ps}$  г/л або більше,  $120$  г/л  $\cdot Y_{ps}$  або більше або може складати, наприклад, від  $25 \cdot Y_{ps}$  г/л до  $250 \cdot Y_{ps}$  г/л, від  $30 \cdot Y_{ps}$  г/л до  $200 \cdot Y_{ps}$  г/л, від  $40 \cdot Y_{ps}$  г/л до  $200 \cdot Y_{ps}$  г/л, від  $50 \cdot Y_{ps}$  г/л до  $200 \cdot Y_{ps}$  г/л, від  $60 \cdot Y_{ps}$  г/л до  $200 \cdot Y_{ps}$  г/л, від  $70 \cdot Y_{ps}$  г/л до  $200 \cdot Y_{ps}$  г/л, від  $80 \cdot Y_{ps}$  г/л до  $200 \cdot Y_{ps}$  г/л,  $90 \cdot Y_{ps}$  г/л, від  $80 \cdot Y_{ps}$  г/л до  $200 \cdot Y_{ps}$  г/л.

Таким чином, винахід пропонує спосіб отримання продукту ферментації, який передбачає:

- розщеплювання лігноцелюлози способом, описаним вище, і
- ферментацію отриманого матеріалу з отриманням продукту ферментації.

#### Продукт ферментації

Продукт ферментації за даним винаходом може бути будь-яким корисним продуктом. У одному варіанті здійснення винаходу продукт ферментації є продуктом, вибраним з групи, яка складається з етанолу, n-бутанолу, ізобутанолу, молочної кислоти, 3-гідроксипропіонової кислоти, акрилової кислоти, оцтової кислоти, бурштинової кислоти, фумарової кислоти, яблучної кислоти, ітаконової кислоти, малеїнової кислоти, лимонної кислоти, адипінової кислоти, амінокислоти (такої як лізин, метіонін, триптофан, треонін і аспарагінова кислота), 1,3-пропандіолу, етилену, гліцерину,  $\beta$ -лактамного антибіотика і цефалоспоринолу, вітамінів, фармацевтичних засобів, добавок до корму для тварин, спеціальних хімічних засобів, хімічної промислової сировини, пластмас, розчинників, палива, включаючи біопаливо і біогаз, або органічних полімерів і промислового ферменту, такого як протеаза, целюлаза, амілаза,

глюканаза, лактаза, ліпаза, ліаза, оксидоредуктаза, трансфераза або ксиланаза.

Вилучення продукту ферментації

Для вилучення продукту ферментації застосовуються існуючі технології. Для різних продуктів ферментації придатними є різні процеси вилучення. Існуючі технології вилучення етанолу з водних сумішей традиційно використовують методи фракціонування і адсорбції. Наприклад, для обробки ферментованого продукту, який містить етанол у водній суміші, можна використовувати брагоперегонний апарат для отримання багатой на етанол суміші, яку можна піддати подальшому фракціонуванню (наприклад, фракційній дистиляції або іншим аналогічним методам). Потім фракції, які містять максимальні концентрації етанолу, можна пропустити через адсорбер для видалення більшої частини (якщо не всієї) залишкової води з етанолу.

Наступні приклади ілюструють винахід.

Приклади

Якщо не вказано що-небудь інше, то використані методи є стандартними біохімічними методами. Приклади відповідних довідників за загальною методологією включають Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (1989) і Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley & Sons, Inc.

Трансформація *S. cerevisiae*

Трансформацію *S. cerevisiae* проводили, як описано Gietz and Woods (2002; Transformation of the yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology*, 350: 87-96).

Колонії

Ізолят одиначної колонії відбирали пластиковою зубочисткою і ресуспендували в 50 мкл milliQ-води. Зразок інкубували протягом 10 хвилин при 99 °C. 5 мкл інкубованого зразка використовували як матрицю для ПЛР реакції із застосуванням ДНК-полімерази Phusion® (Finnzymes) відповідно до інструкції виробника.

Умови ПЛР реакції:

стадія 1 3 хв. 98 °C

стадія 2 10 сек. 98 °C

стадія 3 15 сек. 58 °C повторення стадій 2 - 4 протягом 30 циклів

стадія 4 30 сек. 72 °C

стадія 5 4 хв. 72 °C

стадія 6 30 сек. 20 °C

Склад поживного середовища

Експерименти з вирощування: штами *Saccharomyces cerevisiae* вирощували на середовищі, яке має наступний склад: 0,67% (мас./об.) дріжджової азотистої основи або синтетичного середовища (Verduyn et al., *Yeast* 8:501-517, 1992) і або глюкоза, арабіноза, галактоза, або ксилоза або комбінація цих субстратів (див. нижче). Для чашок з агаром до середовища додавали 2% (мас./об.) бактеріологічного агару.

Отримання етанолу: культивування проводили при 30 °C в 100 мл синтетичного модельного середовища (Verduyn-середовище [Verduyn et al., *Yeast* 8:501-517, 1992] з 5 % глюкози, 5 % ксилози, 3,5 % арабінози і 1%-1,5% галактози) в BAM (монітор біологічної активності, Halotec, The Netherlands). Перед стерилізацією pH середовища встановлювали на рівні pH 4,2 за допомогою 2 M NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. До синтетичного середовища для анаеробного культивування додавали 0,01 г/л ергостабілу (ергостерину) і 0,42 г/л Твін 80, розчиненого в етанолі (Andreasen and Stier. *J. Cell Physiol.* 41:23-36, 1953; and Andreasen and Stier. *J. Cell Physiol.* 43:271-281, 1954). Культури перемішували магнітною мішалкою. Анаеробні умови в ході ферментації досягалися швидко, оскільки культура не була аерована. Проводили безперервний моніторинг утворення CO<sub>2</sub>. Конверсію цукрів і утворення продуктів ферментації аналізували ЯМР-методом. Моніторинг зростання вели за необхідною оптичною щільністю культури при 600 нм на спектрофотометрі LKB Ultraspec K.

Попередні культури отримували інокуляцією 25 мл Verduyn-середовища (Verduyn et al., *Yeast* 8:501-517, 1992) з додаванням 2 % глюкози замороженою початковою (вихідною) культурою або одиначною колонією з чашки з агаром в періодично струшуваний колбі на 100 мл. Після інкубації при 30 °C в орбітальному шейкері (200 об./хв.) протягом приблизно 24 годин проводили збір клітин з культури і використовували їх для інокуляції BAM при OD 600, рівною приблизно 2.

Приклад 1

Введення генів *araA*, *araB* і *araD* в геном *S. cerevisiae*.

1.1 Конструювання вектора експресії, який містить гени для арабінозного шляху

Плазмиду pPWT018, представлену на Фіг. 2, конструювали таким чином: вектор pPWT006 (Фіг. 1), який складається з SIT2-локуса (Gottlin-Ninfa and Kaback (1986) *Molecular and Cell*

Biology, vol. 6, no. 6, 2185-2197) і маркерів, що дозволяють проводити відбір трансформантів за стійкістю до антибіотика G418 і за здатністю до зростання на ацетаміді (див. вище), розщеплювали ферментами рестрикції BsiWI і MluI. kanMX-маркер, який надає стійкості до G418, був виділений з p427TEF (Dualsystems Biotech), а фрагмент, який містить amdS-маркер, описаний раніше в літературі (Swinkels, B.W., Noordermeer, A.C.M. and Renniers, A.C.H.M (1995) The use of the amdS cDNA of *Aspergillus nidulans* as a dominant, bidirectional selectable marker for yeast transformation. Yeast Volume 11, Issue 1995A, page S579; і US 6051431). Гени, які кодують арабінозоізомеразу (araA), L-рибулокіназу (araB) і L-рибулозо-5-фосфат-4-епімеразу (araD) з *Lactobacillus plantarum*, як описано в патентній заявці WO2008/041840, синтезували за допомогою BaseClear (Leiden, The Netherlands). Один великий фрагмент, який несе три вищезазначені ара-гени, був синтезований і знаходився під контролем сильних промоторів з *S. cerevisiae* (або був функціонально пов'язаний з промоторами), тобто TDH3-промотора, який контролює експресію araA-гена; ENO1-промотора, який контролює araB-ген, і PG11-промотора, який контролює araD-ген. Цей фрагмент був оточений унікальними ферментами рестрикції Acc65I і MluI. Клонування цього фрагмента у векторі pPWT006, розщепленому ферментами рестрикції MluI і BsiWI, дозволило отримати плазмиду pPWT018 (Фіг. 2). Послідовність плазмиди pPWT018 представлена в SEQ ID 17.

### 1.2 Трансформація дріжджів

CEN.PK113-7D (MATa URA3 HIS3 LEU2 TRP1 MAL2-8 SUC2) був трансформований плазмидою pPWT018, яка заздалегідь була лінеаризована з використанням SfiI (New England Biolabs) відповідно до інструкції виробника. Синтетичний SfiI-сайт був сконструйований в 5'-фланку SIT2-гена (див. Фіг. 2). Трансформаційні суміші висівали на чашки з YPD-агаром (на літр: 10 грамів дріжджового екстракту, 20 грамів/літр пептону, 20 грамів/літр декстрази, 20 грамів агару), який містить 100 мкг G418 (Sigma Aldrich) /мл. Через дві – чотири добу на чашках з'явилися колонії, тоді як негативний контроль (тобто без додавання ДНК в експерименті із трансформації) показав відсутність зростання колоній на YPD/G418-чашках. Інтеграція плазмиди pPWT018 націлена на SIT2-локус. Для характеристики трансформантів використовували ПЛР-аналіз і метод Саузерн-блотінга.

Реакції ПЛР, які служать ознакою коректної інтеграції однієї копії плазмиди pPWT018, виконували з праймерами, представленими SEQ ID 18 і 15, 15 і 14 (див. Фіг. 4). Коректність інтеграції в SIT2-локусі контролювалася парою праймерів SEQ ID 18 і 15. Якщо плазміда pPWT018 інтегрується в множинні копії (інтеграція за типом голова-до-хвоста), то пара праймерів SEQ ID 15 і 14 дає один ПЛР- продукт. Відсутність такого ПЛР-продукту указує на інтеграцію однокопійної плазмиди pPWT018. Штам, в якому одна копія плазмиди pPWT018 була інтегрована в SIT2-локус, був позначений як BIE104R2.

### 1.3 Збереження маркера

Щоб зробити можливою трансформацію дріжджового штаму іншими конструктами, які використовують ті ж самі селективні маркери, необхідно видалити селектовані маркери. Конструкція плазмиди pPWT018 така, що при інтеграції pPWT018 в хромосому гомологічні послідовності знаходяться в безпосередній близькості одна з одною. Така конструкція забезпечує втрату селектованих маркерів в результаті спонтанної внутрішньомолекулярної рекомбінації цих гомологічних областей.

При вегетативному зростанні внутрішньомолекулярна рекомбінація має місце, хоча і з низькою частотою. Частота цієї рекомбінації залежить від довжини гомології і локусу в геномі (неопубліковані результати). При послідовному перенесенні субфракції культури на свіже середовище внутріклітинні рекомбінанти з часом акумулюються.

З цією метою штам BIE104R2 культивували в YPD-середовищі (на літр: 10 грамів дріжджового екстракту, 20 грамів/літр пептону, 20 грамів/літр декстрази), починаючи з ізоляту одиничної колонії. Для інокуляції свіжій YPD-середовища використовували 25 мкл культури, отриманої культивуванням штаму протягом ночі. Після, щонайменше, п'яти таких послідовних перенесень визначали оптичну щільність культури і клітини розводили до концентрації приблизно 5000 в 1 мл. 100 мкл клітинної суспензії висівали на чашки з середовищем Yeast Carbon Base (Difco), яке містить 30 мМ KPi (pH 6,8), 0,1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 мМ фторацетаміду (Amersham) і 1,8% агару (Difco). Клітини, ідентичні до клітин штаму BIE104R2, тобто без внутріклітинної рекомбінації, все ще містять amdS-ген. Для цих клітин фторацетамід токсичний. Ці клітини не здатні рости і не утворюють колоній на середовищі, яке містить фторацетамід. Проте, якщо внутрішньомолекулярна рекомбінація мала місце, то BIE104R2-варіанти, які втратили селектовані маркери, будуть здатні рости на середовищі, яке містить фторацетамід, оскільки вони не здатні до конверсії фторацетаміду в сполуки, які інгібують ріст. Ці клітини і формуватимуть колонії на вказаному вище агаровому середовищі.



Отримані таким шляхом стійкі до фторацетаміду колонії піддавали ПЛР-аналізу з використанням праймерів SEQ ID 18 і 15, 14 і 19. Праймери SEQ ID 18 і 5 дають смугу в тому випадку, якщо рекомбінація селектованих маркерів відбулася, як і очікувалося. В результаті цього касета з генами *araA*, *araB* і *araD* під контролем сильних промоторів дріжджів інтегрувалася в *SIT2*-локус генома штаму-хазяїна. В цьому випадку ПЛР-реакція з використанням праймерів SEQ ID 14 і 19 не повинна призводити до утворення ПЛР-продукту, оскільки праймер 14 здатний праймувати в області, яка повинна бути втрачена в результаті рекомбінації. Якщо ж вказані праймери дають смугу, то це служить ознакою присутності повної плазмиди *pPWT018* в геномі, отже, рекомбінація не мала місця.

Якщо праймери SEQ ID 18 і 15 не приводять до отримання ПЛР-продукту, то це означає, що рекомбінація відбулася, але таким шляхом, що повна плазміда *pPWT018* рекомбінувалася поза геномом. Втрачені були не тільки селектовані маркери, але і гени арабінози. Фактично дріжджі переродилися в дріжджі дикого типу.

Ізоляти, які показали результати ПЛР відповідно до інтеграції однієї копії *pPWT018*, піддавали аналізу Саузерн-блотінгом. Хромосомну ДНК штамів *CEN.PK113-7D* і коректні рекомбінанти розщеплювали за допомогою *EcoRI* і *HindIII* (подвійне розщеплення). Був сконструйований *SIT2*-зонд з праймерами SEQ ID 20 і 21 з використанням хромосомної ДНК штамів *CEN.PK113-7D* як матриці. Результат експерименту з гібридизації показаний на Фіг. 3. Очікуваний патерн гібридизації може бути виділеним з фізичних карт, представлених на Фіг. 4 (панелі a і b).

У штамі дикого типу спостерігається смуга 2,35 т.п.н., яка відповідає передбачуваному розміру гена дикого типу (Фіг. 4, панель a). Після інтеграції і часткової втрати рекомбінацією плазмиди *pPWT018* очікувалася смуга в 1,06 т.п.н. (Фіг. 4, панель b). І ця смуга дійсно спостерігається, як показує Фіг. 3 (доріжка 2).

Одним з штамів, які показали коректний патерн смуг на Саузерн-блоті (як можна бачити з Фіг. 3), є штам, позначений як *BIE104A2*.

1.4 Введення чотирьох конститутивно експресованих генів неокислювального пентозофосфатного шляху

*Saccharomyces cerevisiae* *BIE104A2*, який конститутивно експресує гени *araA*, *araB* і *araD*, був трансформований плазмідом *pPWT080* (Фіг. 5). Послідовність плазмиди *pPWT080* представлена в SEQ ID NO: 4. Процедура трансформації і селекції після відбору однокопійного трансформанта аналогічна до описаної вище в розділах 1.1, 1.2 і 1.3. Якщо говорити коротко, то *BIE104A2* був трансформований *Sfil*-розщепленою плазмідом *pPWT080*. Трансформаційні суміші висівали на чашки з YPD-агаром (з розрахунку на літр: 10 грамів дріжджового екстракту, 20 грамів/літр пептону, 20 грамів/літр декстрози, 20 грамів агару), що містить 100 мкг G418 (Sigma Aldrich)/мл.

Через дві - чотири доби на чашках з'явилися колонії, тоді як негативний контроль (тобто без додавання ДНК в експерименті по трансформації) не показав зростання на чашках з YPD/G418.

Інтеграція плазмиди *pPWT080* націлена на *GRE3*-локус. Характеристики трансформантів визначали за допомогою ПЛР і Саузерн-блотінгу.

Трансформант, який показав коректну інтеграцію однієї копії плазмиди *pPWT080* відповідно до очікуваного патерну гібридизації, був позначений як *BIE104A2F1*.

Щоб зробити можливим введення генів, які кодуєть ксилоізомеразу і ксилулокіназу (Приклад 5), необхідно видалити селективні маркери, введені інтеграцією плазмиди *pPWT080*. З цією метою штам *BIE104A2F1* культивували в YPD-середовищі, починаючи з ізоляту колонії. 25 мкл культури, отриманої культивуванням протягом ночі, використовували для інокуляції свіжого YPD-середовища. Після п'яти послідовних перенесень визначали оптичну щільність культури, і клітини розбавляли до концентрації приблизно 5000 в 1 мл. 100 мкл клітинної суспензії висівали на чашки з середовищем Yeast Carbon Base (Difco), яке містить 30 мМ KPi (рН 6,8), 0,1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 40 мМ фторацетаміду (Amersham) і 1,8% агару (Difco). Стійкі до фторацетаміду колонії піддавали ПЛР-аналізу, і у випадку коректних ПЛР-профілів – Саузерн-блотінгу (розділ 1.3 Прикладу 1). Одним з штамів, які показали коректний патерн смуг на Саузерн-блоті, є штам, позначений як *BIE104A2P1*.

#### Приклад 2

##### Адаптивна еволюція

##### 2.1 Адаптивна еволюція (аеробні умови)

Ізолят одиначної колонії штаму *BIE104A2P1* використовували для інокуляції YNB-середовища (Difco), до якого додавали 2% галактози. Попередню культуру інкубували протягом приблизно 24 годин при 30 °C і 280 об./хв. Далі проводили збір клітин в культурі і інокуляцію YNB-середовища, яке містить 1% галактози і 1% арабінози при початковій OD 600, рівній 0,2

(Фіг. 8). Клітини росли при 30 °C і 280 об./хв. Проводили регулярний моніторинг оптичної щільності при 600 нм.

Коли оптична щільність досягла значення 5, аліквоту культури переносили на свіже YNB-середовище такого ж складу, який був вказаний вище. Кількість доданих клітин була такою, щоб початкова OD 600 культур складала 0,2. Після повторного досягнення OD 600, рівною 5, аліквоту культури переносили на YNB-середовище, яке містить 2% арабінози як єдине джерело вуглецю (подія, позначена як (1) на Фіг. 8).

Після перенесення на YNB-середовище з 2% арабінози як єдиного джерела вуглецю зростання можна було спостерігати через приблизно два тижні. Коли оптична щільність при 600 нм досягала значення, щонайменше, 1, клітини переносили в періодично струшвану колбу зі свіжим YNB-середовищем, в яке додавали 2% арабінози, з початковою OD 600, рівною 0,2 (фіг. 8).

Послідовне перенесення повторювали тричі, як показано на фіг. 8. Отриманий штам, який показав здатність до швидкого зростання на арабінозі, був позначений як BIE104A2P1c.

## 2.2 Адаптивна еволюція (анаеробні умови)

Після адаптації до зростання на арабінозі за аеробних умов одиничну колонію штаму BIE104A2P1c використовували для інокуляції YNB-середовища, до якого додавали 2% глюкози. Попередню культуру інкубували протягом приблизно 24 годин при 30 °C і 280 об./хв. Далі проводили збір клітин в культурі і інокуляцію YNB-середовища, яке містить 2% арабінози, з оптичною щільністю OD 600, рівною 0,2. Колби закривали водним затвором з метою гарантованого підтримування анаеробних умов зростання після видалення кисню з середовища і вільного простору над середовищем в колбах. Після досягнення OD600 значення, рівного мінімум 3, аліквоту культури переносили на свіже YNB-середовище, яке містить 2% арабінози (Фіг. 9); кожна культура мала оптичну щільність OD 600, рівну 0,2.

Отриманий після декількох пересадок штам був позначений як BIE104A2P1d (=BIE201).

### Приклад 3

#### Визначення ферментативної здатності

Ізоляти одиничних колоній штамів BIE104, BIE104A2P1c і BIE201 використовували для інокуляції YNB-середовища (Difco), в яке додавали 2% глюкози. Попередні культури інкубували протягом приблизно 24 годин при 30 °C і 280 об./хв. Далі проводили збір клітин в культурі і інокуляцію синтетичного модельного середовища (Verduyn et al., Yeast 8:501-517, 1992; 5% глюкози, 5% ксилози, 3,5% арабінози, 1% галактози) з початковою OD 600, рівною приблизно 2, в BAM. Проводили постійний моніторинг продукування CO<sub>2</sub>. Конверсію цукрів і утворення продуктів аналізували ЯМР-методом. Дані представляють залишкову кількість цукрів у вказаному середовищі (глюкоза, арабіноза, галактоза і ксилоза в грамах/літр) і утворення (побічних) продуктів (етанолу, гліцерину). Моніторинг росту вели за оптичною щільністю культури при 600 нм (Фіг. 10, 11, 12). Тривалість експерименту склала близько 140 годин.

Експерименти чітко показують, що референс-штам BIE104 швидко конвертує глюкозу, але він не здатний конвертувати ні арабінозу, ні галактозу за 140 годин (Фіг. 10). Проте штами BIE104A2P1c і BIE201 здатні конвертувати арабінозу і галактозу (Фіг. 11 і 12, відповідно). Утилізація галактози і арабінози почалася відразу ж після виснаження глюкози опісля менше ніж 20 годин. Конверсія обох цукрів була одночасною. Проте штам BIE201, який було покращено для зростання на арабінозі за анаеробних умов, споживав обидва цукри набагато швидше (Фіг. 12). У всіх процесах ферментації наголошувалася утворення тільки гліцерину як побічного продукту. Дані ферментації штамом BIE201 приводяться нижче в табл. 2.

Таблиця 2. Концентрації цукрів і концентрації етанолу (г/л) в процесі ферментації штамом BIE201, як показано на Фіг. 12. Максимальна концентрація етанолу розраховується шляхом множення концентрацій на 0,51 для кожного цукру і подальшого підсумовування. Концентрація етанолу в 136 год. (39,2 г/л) означає вихід етанолу – 0,45 етанолу/г цукру. Цей вихід показує, що всі цукри перетворилися на етанол.

## Концентрації в г/л

| Час (год.) | Glu  | Xyl  | Ara  | Gal  | ЕТОН |
|------------|------|------|------|------|------|
| 0          | 42,8 | 50,2 | 31,6 | 12,9 | 0,7  |
| 16         | 0,1  | 54,1 | 35,8 | 10,8 | 22,9 |
| 23         | 0,0  | 49,2 | 31,3 | 8,4  | 18,7 |
| 39         | 0,1  | 52,8 | 16,3 | 0,7  | 32,1 |
| 48         | 0,0  | 52,5 | 8,9  | 0,2  | 29,4 |
| 65         | 0,0  | 55,1 | 4,3  | 0,3  | 40,3 |
| 111        | 0,0  | 48,8 | 0,5  | 0,3  | 38,1 |
| 136        | 0,0  | 49,6 | 0,2  | 0,3  | 39,2 |

Максимальні концентрації етанолу (у г/л) з

глюкози 21,8

арабінози 16,1

галактози 6,6

Всього 44,5

Вихід етанолу в експериментах 0,45 г етанолу/г цукру

З цього розрахунку очевидно, що кожен з цукрів – глюкоза, галактоза і арабіноза – конвертувався в етанол.

Приклад 4

Вплив PPP-генів на конверсію цукрів

Для вивчення впливу PPP-генів на конверсію цукрів одиничні колонії штамів BIE104A2 і BIE105A2 використовували для інокуляції YNB-середовища (Difco), до якого додавали 2% глюкози. Обидва штами містять ара-гени і були еволюціонованими для зростання на арабінозі (як описано в Прикладі 2, розділ 2.1). Основою штаму BIE105A2 є промисловий штам. Проте він був трансформований такими ж методами і конструктами, які описані вище (Приклад 1, підрозділ 1.2).

Попередні культури збирали і інокулювали в синтетичному модельному середовищі з кукурудзяними волокнами (Verduyn et al., Yeast 8:501-517, 1992; 5% глюкози, 5% ксилози, 3,5% арабінози, 1,5% галактози) з початковою OD 600, яка дорівнює приблизно 2, в BAM. Проводили постійний моніторинг продукування CO<sub>2</sub>. Конверсію цукрів і утворення продуктів аналізували ЯМР-методом. Дані представляють залишкову кількість цукрів у вказаному середовищі (глюкоза, арабіноза, галактоза і ксилоза в грамах/літр) і утворення (побічних) продуктів (етанолу, гліцерину). Моніторинг зростання вели за оптичною щільністю культури при 600 нм. Тривалість експерименту склала близько 160 годин.

Експерименти показують, що обидва штами здатні конвертувати арабінозу і галактозу відразу після виснаження глюкози без гіперекспресії PPP-генів (Фіг. 13 і 14).

Приклад 5

Введення конститутивно експресованих генів, які кодують ксилоізомеразу і ксилулокіназу

5.1 Трансформація дріжджів

Штам BIE104A2P1 (MATa URA3 HIS3 LEU2 TRP1 MAL2-8 SUC2 SIT2:[TDH3-araA, ENO1-araB, PGI1-araD] ΔGRE3:[TPI1p-TAL1, ADH1p-TKL1, PGI1p-RPE1, ENO1p-RKI1]) трансформували плазмідом pPWT042 (Фіг. 16). Плазміда pPWT042 була отримана з вектора pPWT007 (Фіг. 15). Вона містить оптимізовану парю кодонів ксилулокіназу з *S. cerevisiae* і оптимізовану парю кодонів ксилоізомеразу з *Bacteroides uniformis* (SEQ 2), як описано в патентній заявці РСТ/ЕР2009/52623. Перед трансформацією штаму BIE104A2P1 плазміда pPWT042 була лінеаризована з використанням ферменту рестрикції SfiI відповідно до інструкції виробника. Трансформаційні суміші висівали на чашки з YPD-агаром (на літр: 10 грамів дріжджового екстракту, 20 грамів/літр пептону, 20 грамів/літр декстрази, 20 грамів агару), який містить 100 мкг G418 (Sigma Aldrich) /мл.

Через дві - чотири доби на чашках з'явилися колонії, тоді як негативний контроль (тобто без додавання ДНК в експерименті з трансформації) не показав зростання на чашках з YPD/G418.

Після розщеплювання плазмиди pPWT042 за допомогою SfiI її інтеграція націлена на SIT4-локус (Gottlin-Ninfa and Kaback (1986) Molecular and Cellular Biology Vol. 6, No. 6, 2185-2197) в геномі (Фіг. 17). Характеристики трансформантів проводили методами ПЛР і Саузерн-блотінга, як описано в Прикладі 1 (розділ 1.2).

Штам з однією копією плазмиди pPWT042, інтегрованою в геном, був позначений як BIE104A2P1Y9.

## 5.2 Експерименти із зростання

Ізоляти одиничних колоній штамів BIE104A2P1Y9 використовували для інокуляції YNB-середовища (Difco), до якого додавали 2% глюкози або 2% галактози. Інокульоване середовище в колбах інкубували при 30 °C і 280 об./хв. до досягнення оптичної щільності при 600 нм значення, що дорівнює, щонайменше, 2,0.

YNB-середовище з додаванням 1% арабінози і 1% ксилози інокулювали культурами, які інкубуються протягом ночі, при початковій OD 600, рівній 0,2. Клітини росли при 30 °C і 280 об./хв. Вели регулярний моніторинг оптичної щільності при 600 нм. Коли оптична щільність досягла значення вище 2,0, аліквоту культури переносили на свіже YNB-середовище, яке містить 2% ксилози і 0,2% арабіноз. Кількість доданих клітин була такою, щоб початкова OD 600 культур складала 0,2.

Моніторинг оптичної щільності проводили регулярно. Результати представлені на Фіг. 18, панель а (попередні культури на галактозі) і панель b (попередні культури на глюкозі).

Результати чітко показують, що штами здатні утилізувати глюкозу, галактозу, арабінозу і ксилозу.

## 5.3 Збереження маркера

Для видалення селективного маркера, введеного інтеграцією плазмиди pPWT042, штам BIE104A2P1Y9 культивували в YPD-середовищі, починаючи з ізоляту одиничної колонії. 25 мкл культури, отриманої культивуванням протягом ночі, використовували для інокуляції свіжого YPD-середовища. Після серії послідовних перенесень визначали оптичну щільність культури, і клітини розбавляли до концентрації приблизно 5000 в 1 мл. 100 мкл клітинної суспензії висівали на чашки з середовищем Yeast Carbon Base (Difco), що містить 30 мМ KPi (pH 6,8), 0,1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 мМ фторацетаміду (Amersham) і 1,8% агару (Difco). Стійкі до фторацетаміду колонії піддавали ПЛР-аналізу, а у випадку коректних ПЛР-профілів – Саузерн-блотінгу (підрозділ 1.3, Приклад 1). Одним з штамів, який показали коректний патерн смуг на Саузерн-блоті, є штам, який був позначений як BIE104A2P1X9.

## 5.4 Експерименти із зростання

Ізоляти одиничних колоній штаму BIE104A2P1X9 (BIE104A2P1X9a1 і BIE104A2P1X9a2) використовували для інокуляції Verduyn-середовища (Difco), до якого додавали 2% глюкози. Колби з інокульованим середовищем інкубували при 30 °C і 280 об./хв. протягом приблизно 24 годин.

Verduyn-середовище з додаванням 2% ксилози інокулювали культурами, отриманими інкубацією протягом ночі, з початковою OD 600, рівною 0,2. Клітини росли при 30 °C і 280 об./хв. Проводили регулярний моніторинг оптичної щільності при 600 нм. Результати показані на Фіг. 19.

Результати чітко показують, що обидві автономні колонії штаму BIE104A2P1X9 все ще здатні утилізувати ксилозу після вилучення маркера. Як показано вище в Прикладі 3, штам здатний утилізувати глюкозу, арабінозу і галактозу (Фіг. 11 і Фіг. 12).

## Приклад 6

Трансформація *S. cerevisiae* для отримання бурштинової кислоти на арабінозі і галактозі

### 6.1. Експресійні конструкти

Експресійний конструкт pGBS414PPK-3, який містить фосфоенол-піруват-карбоксикиназу PCKa (Е.С. 4.1.1.49) з *Actinobacillus succinogenes* і глікосомальну фумаратредуктазу FRDg (Е.С. 1.3.1.6) з *Trypanosoma brucei*, і експресійний конструкт pGBS415FUM3, який містить фумаразу (Е.С. 4.2.1.2.) з *Rhizopus oryzae* і пероксисомальну малатдегідрогеназу MDH3 (Е.С. 1.1.1.37), конструювали, як описано раніше в WO2009/065778 на стор. 19-20 і 22-30, включений до даного опису у вигляді посилання разом з фігурами і списком послідовностей.

Експресійний конструкт pGBS416ARAABD, який містить гени *araA*, *araB* і *araD* з *Lactobacillus plantarum*, конструювали шляхом клонування продукту ПЛР, який містить касету *araABD*-експресії з плазмиди pPWT018, в плазмиді pRS416. ПЛР-фрагмент отримували за допомогою ДНК-полімерази Phusion® (Finnzymes) і ПЛР-праймерів, визначених тут як SEQ ID 22 і SEQ ID 23. ПЛР-продукт розщеплювали ферментами рестрикції SALI і NOTI, як і плазмиду pRS416. Після лігування і трансформації *E. coli* TOP10 відбирали правильні рекомбінанти на основі рестрикційного аналізу. Фізична карта плазмиди pGBS416ARAABD представлена на Фіг. 20.

### 6.2. Штами *S. cerevisiae*

Плазмиди pGBS414PPK-3, pGBS415-FUM-3 трансформували в штам *S. cerevisiae* CEN.PK113-6B (MATA *ura3-52 leu2-112 trp1-289*). На додачу до цього, у вказаний штам трансформували плазмиду pGBS416ARAABD з метою створення прототрофних штамів дріжджів. Експресійні вектори трансформували в дріжджі електропорацією. Трансформаційну суміш висівали на чашки з середовищем Yeast Nitrogen Base (YNB) мас./об. AA (Difco) + 2%

глюкози.

Штами піддавали адаптивній еволюції (див. підрозділ 2) для зростання на арабінозі як єдиному джерелі вуглецю.

#### 6.3. Експерименти із зростання і отримання бурштинової кислоти

- 5 Трансформантами інокулювали 20 мл середовища для попередньої культури, яке складається з Verduyn-середовища (Verduyn et al., 1992, Yeast. July. 8(7): 501-17), яке містить 2% галактози (мас./об.); зростання трансформантів відбувалося за анаеробних умов в періодично струшуваних колбах на 100 мл в термостаті із струшуючим механізмом при 30 °C і 250 об./хв. Через приблизно 24 години клітини чотири рази переносили на свіже Verduyn-середовище, яке містить або 2% глюкози, 2% галактози або 2% арабінози, або їх суміші. Дві колби інкубували за аеробних умов, дві – за анаеробних умов, наприклад, шляхом закривання колб водяним затвором або шляхом інкубації в анаеробному орбітальному шейкері. Зразки культур відбирали з інтервалами в часі. Зразки центрифугували 5 хвилин при 4750 об./хв. 1 мл супернатанту використовували для вимірювання рівнів бурштинової кислоти ВЕРХ-методом (методом високоефективної рідинної хроматографії), як описано в розділі 6.4.

#### 6.4. ВЕРХ-аналіз

- 20 ВЕРХ застосовували для визначення органічних кислот і цукрів. Принцип розділення на колонці Phenomenex Rezex-RHM-Monosaccharide заснований на розмірній ексклюзії за розміром, іонній ексклюзії і іонному обміні з використанням механізмів оберненої фази. Детектування проводили за допомогою диференціального детектора індексу рефракції і ультрафіолетового детектора.

Джерела інформації:

№ з/п Джерело

- (1) Bioresource Technology 1994 Vol. 47, p. 283-284
- (2) Micard, Enzyme Microbiol. Technology 1996 Vol. 19, p. 163-170
- (3) DOE Radke, Idaho wheat straw composition
- (4) Grohman and Botast Process Biochemistry 1997 Vol. 32, No. 5, 405-415
- (5) Saska B&B 1995, 517-523
- (6) PCT/EP2009/52623
- (7) Zheng Appl. Biochem. Microbiol. 2007 Vol. 136-140, p. 423-436
- (8) Bradshaw Appl. Biochem. Microbiol. 2007 Vol. 136-140, p. 395-406
- (9) Cara Appl. Biochem. Microbiol. 2007 Vol. 136-140, p. 379-394.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; ДСМ АЙПІ АСЕТС Б.В.

&lt;120&gt; СПОСІБ ФЕРМЕНТАЦІЇ ГАЛАКТОЗИ

&lt;130&gt; 27392-WO-PCT

&lt;160&gt; 23

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1317

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Штучні послідовності

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Bacteroides uniformis

&lt;400&gt; 1

```

atggcaaca aagagtatt tcccgaata ggaagatta aattcgaagg taaagagagc   60
aagaaccga tggcattccg ttattacgat gccgataaag taatcatggg taagaaaatg   120
agcgaatggc tgaagttcgc catggcatgg tggcacactc tttcgcaga aggtggtgac   180
caattcgggtg gcggaacaaa gaaattcccc tggaacgggtg aggtcgacaa ggttcaggct   240
gccagacaa aaatggacgc cggctttgaa ttcatgcaga aaatgggtat cgaatactac   300
tgcttcacg atgtagacct ctgcgaaga gccgagacca ttgaagaata cgaagccaac   360
ttgaaggaaa tcgtagcgta tgccaagcag aaacaagcag aaaccggcat caaactgttg   420
tggggtactg ccaacgtatt cggccatgcc cgctacatga atgtgcagc caccaatccc   480
gatttcgatg ttgtggcagc tgccgccatc caaatcaaaa acgccatcga cgctactatc   540
gaactgggag gctcaaaact tgtattctgg ggcggtcgag aaggctacat gtcatgtctg   600
aatacagacc agaagcgtga gaaagagcac ctgcacaga tgttgacct cggccgac   660
tatgcacgtg ccccggtctt caaaggtacc ttcttgattg aaccgaaacc gatggaacct   720
acaaaacacc agtatgatgt agacaccgaa accgttatcg gcttctgaa ggctcacaat   780
ctggacaaag atttcaaggt gaacatcgaa gtgaaccacg ctactttggc gggccacacc   840
ttcgagcagc aactcgagtg agccgtagac aacggtagtc tcggctccat cgacgccaac   900
cgtggtgact accagaacgg ctgggataca gaccagttcc ccattgacaa cttcgaactg   960
acccaggcaa tgatgcaaat catccgtaac ggaggctttg gcaatggcgg tacaacttc   1020
gatccaaga cccgtcgcaa ctccaccgac ctggaagaca ttttcattgc ccacatgcc   1080
ggataggacg tgatggcagc tgcactggaa agtcagacca aactgcttga agagtctct   1140
tacaagaaga tgctggccga ccgctatgct tcctcgaca gtgtaaaagg caaggaattt   1200
gaagatggca aactgacgct ggaggatttg gtagcttacg caaaagccaa cggtgagccg   1260
aaacagacca gcggcaagca ggaattgtat gaggcaatcg tgaatatgta ctgctaa   1317

```

<210> 2  
 <211> 1318  
 <212> DNA  
 <213> Штучні послідовності  
 <220>  
 <223> Bacteroides uniformis кодон оптимізованої послідовності  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1314)  
 <400> 2

```

atg gct acc aag gaa tac ttc cca ggt att ggt aag atc aaa ttc gaa      48
Met Ala Thr Lys Glu Tyr Phe Pro Gly Ile Gly Lys Ile Lys Phe Glu
1      5      10      15

ggt aag gaa tcc aag aac cca atg gcc ttc aga tac tac gat gct gac      96
Gly Lys Glu Ser Lys Asn Pro Met Ala Phe Arg Tyr Tyr Asp Ala Asp
      20      25      30

aag gtt atc atg ggt aag aag atg tct gaa tgg tta aag ttc gct atg      144
Lys Val Ile Met Gly Lys Lys Met Ser Glu Trp Leu Lys Phe Ala Met
      35      40      45

gct tgg tgg cat acc ttg tgt gct gaa ggt ggt gac caa ttc ggt ggt      192
Ala Trp Trp His Thr Leu Cys Ala Glu Gly Gly Asp Gln Phe Gly Gly
      50      55      60

ggt acc aag aaa ttc cca tgg aac ggt gaa gct gac aag gtc caa gct      240
Gly Thr Lys Lys Phe Pro Trp Asn Gly Glu Ala Asp Lys Val Gln Ala
      65      70      75      80

gct aag aac aag atg gac gct ggt ttc gaa ttt atg caa aag atg ggt      288
Ala Lys Asn Lys Met Asp Ala Gly Phe Glu Phe Met Gln Lys Met Gly
      85      90      95

att gaa tac tac tgt ttc cac gat gtt gac ttg tgt gaa gaa gct gaa      336
Ile Glu Tyr Tyr Cys Phe His Asp Val Asp Leu Cys Glu Glu Ala Glu
      100     105     110

acc atc gaa gaa tac gaa gct aac ttg aag gaa att gtt gct tac gct      384
Thr Ile Glu Glu Tyr Glu Ala Asn Leu Lys Glu Ile Val Ala Tyr Ala
      115     120     125

aag caa aag caa gct gaa act ggt atc aag cta tta tgg ggt act gct      432
Lys Gln Lys Gln Ala Glu Thr Gly Ile Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala
      130     135     140
  
```

aac gtc ttt ggt cat gcc aga tac atg aac ggt gcc gct acc aac cca 480  
 Asn Val Phe Gly His Ala Arg Tyr Met Asn Gly Ala Ala Thr Asn Pro  
 145 150 155 160  
 gat ttc gat gtt gtt gcc aga gct gcc atc caa atc aag aac gcc atc 528  
 Asp Phe Asp Val Val Ala Arg Ala Ala Ile Gln Ile Lys Asn Ala Ile  
 165 170 175  
 gat gct acc att gaa tta ggt ggt tcc aac tac gtt ttc tgg ggt ggt 576  
 Asp Ala Thr Ile Glu Leu Gly Gly Ser Asn Tyr Val Phe Trp Gly Gly  
 180 185 190  
 aga gaa ggt tac atg tcc ttg ttg aac act gac caa aag aga gaa aag 624  
 Arg Glu Gly Tyr Met Ser Leu Leu Asn Thr Asp Gln Lys Arg Glu Lys  
 195 200 205  
 gaa cac ttg gct caa atg ttg acc att gct cgt gac tac gct cgt gcc 672  
 Glu His Leu Ala Gln Met Leu Thr Ile Ala Arg Asp Tyr Ala Arg Ala  
 210 215 220  
 aga ggt ttc aag ggt act ttc ttg att gaa cca aag cca atg gaa cca 720  
 Arg Gly Phe Lys Gly Thr Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Met Glu Pro  
 225 230 235 240  
 acc aag cac caa tac gat gtt gac acc gaa act gtc atc ggt ttc ttg 768  
 Thr Lys His Gln Tyr Asp Val Asp Thr Glu Thr Val Ile Gly Phe Leu  
 245 250 255  
 aag gct cac aac ttg gac aag gac ttc aag gtc aac atc gaa gtc aac 816  
 Lys Ala His Asn Leu Asp Lys Asp Phe Lys Val Asn Ile Glu Val Asn  
 260 265 270  
 cac gct act ttg gcc ggt cac act ttc gaa cac gaa ttg gct gtt gct 864  
 His Ala Thr Leu Ala Gly His Thr Phe Glu His Glu Leu Ala Val Ala  
 275 280 285  
 gtc gac aac ggt atg ttg ggt tcc att gat gct aac aga ggt gac tac 912  
 Val Asp Asn Gly Met Leu Gly Ser Ile Asp Ala Asn Arg Gly Asp Tyr  
 290 295 300  
 caa aac ggt tgg gac acc gac caa ttc cca atc gac aac ttt gaa ttg 960  
 Gln Asn Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Ile Asp Asn Phe Glu Leu  
 305 310 315 320  
 act caa gct atg atg caa atc atc aga aac ggt ggt ttc ggt aac ggt 1008  
 Thr Gln Ala Met Met Gln Ile Ile Arg Asn Gly Gly Phe Gly Asn Gly  
 325 330 335



ggt acc aac ttc gat gct aag acc aga aga aac tct act gac ttg gaa 1056

Gly Thr Asn Phe Asp Ala Lys Thr Arg Arg Asn Ser Thr Asp Leu Glu

340 345 350

gat atc ttc atc gct cac att gcc ggt atg gat gtc atg gcc aga gct 1104

Asp Ile Phe Ile Ala His Ile Ala Gly Met Asp Val Met Ala Arg Ala

355 360 365

ttg gaa tct gct gct aaa tta ttg gaa gaa tct cct tac aag aag atg 1152

Leu Glu Ser Ala Ala Lys Leu Leu Glu Glu Ser Pro Tyr Lys Lys Met

370 375 380

ttg gct gac aga tac gct tct ttc gac tct ggt aag ggt aag gaa ttt 1200

Leu Ala Asp Arg Tyr Ala Ser Phe Asp Ser Gly Lys Gly Lys Glu Phe

385 390 395 400

gaa gat ggt aag ttg act ttg gaa gat ttg gtt gct tac gcc aag gct 1248

Glu Asp Gly Lys Leu Thr Leu Glu Asp Leu Val Ala Tyr Ala Lys Ala

405 410 415

aac ggt gaa cca aag caa act tct ggt aag caa gaa ttg tac gaa gcc 1296

Asn Gly Glu Pro Lys Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Leu Tyr Glu Ala

420 425 430

att gtc aac atg tac tgt taag 1318

Ile Val Asn Met Tyr Cys

435

<210> 3

<211> 438

<212> PRT

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний Construct

<400> 3

Met Ala Thr Lys Glu Tyr Phe Pro Gly Ile Gly Lys Ile Lys Phe Glu

1 5 10 15

Gly Lys Glu Ser Lys Asn Pro Met Ala Phe Arg Tyr Tyr Asp Ala Asp

20 25 30

Lys Val Ile Met Gly Lys Lys Met Ser Glu Trp Leu Lys Phe Ala Met

35 40 45

Ala Trp Trp His Thr Leu Cys Ala Glu Gly Gly Asp Gln Phe Gly Gly  
 50            55            60  
 Gly Thr Lys Lys Phe Pro Trp Asn Gly Glu Ala Asp Lys Val Gln Ala  
 65            70            75            80  
 Ala Lys Asn Lys Met Asp Ala Gly Phe Glu Phe Met Gln Lys Met Gly  
 85            90            95  
 Ile Glu Tyr Tyr Cys Phe His Asp Val Asp Leu Cys Glu Glu Ala Glu  
 100           105           110  
 Thr Ile Glu Glu Tyr Glu Ala Asn Leu Lys Glu Ile Val Ala Tyr Ala  
 115           120           125  
 Lys Gln Lys Gln Ala Glu Thr Gly Ile Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala  
 130           135           140  
 Asn Val Phe Gly His Ala Arg Tyr Met Asn Gly Ala Ala Thr Asn Pro  
 145           150           155           160  
 Asp Phe Asp Val Val Ala Arg Ala Ala Ile Gln Ile Lys Asn Ala Ile  
 165           170           175  
 Asp Ala Thr Ile Glu Leu Gly Gly Ser Asn Tyr Val Phe Trp Gly Gly  
 180           185           190  
 Arg Glu Gly Tyr Met Ser Leu Leu Asn Thr Asp Gln Lys Arg Glu Lys  
 195           200           205  
 Glu His Leu Ala Gln Met Leu Thr Ile Ala Arg Asp Tyr Ala Arg Ala  
 210           215           220  
 Arg Gly Phe Lys Gly Thr Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Met Glu Pro  
 225           230           235           240  
 Thr Lys His Gln Tyr Asp Val Asp Thr Glu Thr Val Ile Gly Phe Leu  
 245           250           255  
 Lys Ala His Asn Leu Asp Lys Asp Phe Lys Val Asn Ile Glu Val Asn  
 260           265           270  
 His Ala Thr Leu Ala Gly His Thr Phe Glu His Glu Leu Ala Val Ala  
 275           280           285  
 Val Asp Asn Gly Met Leu Gly Ser Ile Asp Ala Asn Arg Gly Asp Tyr  
 290           295           300  
 Gln Asn Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Ile Asp Asn Phe Glu Leu  
 305           310           315           320  
 Thr Gln Ala Met Met Gln Ile Ile Arg Asn Gly Gly Phe Gly Asn Gly  
 325           330           335

Gly Thr Asn Phe Asp Ala Lys Thr Arg Arg Asn Ser Thr Asp Leu Glu

340 345 350

Asp Ile Phe Ile Ala His Ile Ala Gly Met Asp Val Met Ala Arg Ala

355 360 365

Leu Glu Ser Ala Ala Lys Leu Leu Glu Glu Ser Pro Tyr Lys Lys Met

370 375 380

Leu Ala Asp Arg Tyr Ala Ser Phe Asp Ser Gly Lys Gly Lys Glu Phe

385 390 395 400

Glu Asp Gly Lys Leu Thr Leu Glu Asp Leu Val Ala Tyr Ala Lys Ala

405 410 415

Asn Gly Glu Pro Lys Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Leu Tyr Glu Ala

420 425 430

Ile Val Asn Met Tyr Cys

435

<210> 4

<211> 16176

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 4

```

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tcttgacaca tgcagctccc ggagacggtc   60
acagcttgct tgaagcggga tgcggggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt   120
gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg   180
caccatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc   240
cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta   300
ttacgccagc tggcgaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg   360
ttttccagc cagcagcttg taaaacgacg gccagtaagc ttgcatgcct gcaggtcgac   420
gcggccgcat attttttga actgtaattt cactcatgca caagaaaaaa aaaactggat   480
taaaagggag cccaaggaaa actcctcagc atatatttag aagtctctc agcatatagt   540
tgttgtttt ctttacacat tcaactgtta ataaaacttt tataatattt cattatcgga   600
actctagatt ctatactgt ttccaattg ggccgatcgg gccttgctgg tagtaaacgt   660
atacgtcata aaagggaaaa gccacatgcg gaagaatttt atggaaaaaa aaaaaacctc   720
gaagttacta ctctagggg gcctatcaag taaattactc ctggtacact gaagtatata   780
agggatatag aagcaaatag ttgtcagtgc aatcctcaa gacgattggg aaaatactgt   840

```

aggtaccgga gacctaacta catagtgttt aaagattacg gatatttaac ttacttagaa 900  
 taatgccatt tttttgagtg ataataatcc tacgttagtg tgagcgggat ttaaactgtg 960  
 aggaccttaa tacattcaga cacttctgcg gtatcacctt acttattccc ttgagatta 1020  
 tatctaggaa cccatcaggt tgggtggaaga ttaccggtc taagactttt cagcttctc 1080  
 tattgatgtt acacctggac accccttttc tggcatccag tttttaatct tcagtggcat 1140  
 gtgagattct cgaataataa ttaaagcaat cacacaattc tctcgatac cacctcggtt 1200  
 gaaactgaca ggtggtttgt tacgcatgct aatgcaaagg agcctatata ccttggctc 1260  
 ggctgctgta acaggaataa taaagggcag cataatttag gagtttagtg aacttgaac 1320  
 atttactatt ttccctctct acgtaaatat ttttctttt aattctaaat caatctttt 1380  
 caatttttg ttgtattct tttctgctt aaatctataa ctacaaaaa cacatacata 1440  
 aactaaaaa gtctgaacca gctcaaaaga aacaaaaggt tgctaacaac tctctagaac 1500  
 aattgaaagc ctccggcact gtcgttttg ccgacactgg tgatttcggc tctattgcca 1560  
 agtttcaacc tcaagactcc acaactaacc catcattgat ctggtgctt gccaaagcaac 1620  
 caacttacgc caagttgatc gatgttgccg tggaatacgg taagaagcat ggtaagacca 1680  
 ccgaagaaca agtcgaaat gctgtggaca gattgttagt cgaattcggg aaggagatct 1740  
 taaagattgt tccaggcaga gtctccaccg aagttgatgc tagattgtct ttgacactc 1800  
 aagctacat tgaaaaggct agacatatca ttaaattgtt tgaacaagaa ggtgtctcca 1860  
 aggaagagct ccttattaaa attgcttcca ctgggaagg tattcaagct gccaaagaat 1920  
 tggaagaaaa ggacggtatc cactgtaatt tgactctatt attctcttc gttcaagcag 1980  
 ttgctgtgc cgaggcccaa gttacttga ttccccatt tgttggtaga attctagact 2040  
 ggtacaaatc cagcactggt aaagattaca aggtgaagc cgaccaggt gttatttccg 2100  
 tcaagaaaat ctacaactac tacaagaagt acggttaca gactattgtt atgggtgctt 2160  
 cttcagaag cactgacgaa atcaaaaact tggctggtg tgactatcta acaatttctc 2220  
 cagctttatt ggacaagtg atgaacagta ctgaacctt cccaagagt ttggaccctg 2280  
 tctccgtaa gaaggaagcc ggcgacaaga ttcttacct cagcgacgaa tctaaattca 2340  
 gattcgactt gaatgaagac gctatggcca ctgaaaaatt gtccgaaggt atcagaaaat 2400  
 tctctgccga tatttact ctattcgact tgattgaaa gaaagtacc gcttaaggaa 2460  
 gtatctcga aatattaatt taggcatgt cttatgcac gtttctttg atactacgg 2520  
 gtacatgtac acaagtatat ctatatatat aaattaatga aaatccccta ttatatata 2580  
 tgactttaac gagacagaac agtttttat tttttatct atttgatgaa tgatacagt 2640  
 tcttattcac gtgttatacc cacaccaat ccaatagcaa taccggcat cacaatcact 2700  
 gtttcggcag ccctaagat cagacaaaac atccggaacc acctaaatc aacgtcccat 2760  
 atgaatcctt gcagcaaagc cgctcgtaac ggagatatac aatagaacag ataccagaca 2820  
 agacataatg ggctaaacaa gactacacca attacactgc ctattgatg gtgttacata 2880  
 acgaactaat actgtagccc tagactgat agccatcatc atatcgaagt ttactaccc 2940  
 ttttccatt tgccatctat tgaagtaata ataggcgcat gcaactctt tttttttt 3000

ttcttttctc tctccccgt tgtgtctca ccatatccgc aatgacaaa aaatgatgga 3060  
 agacactaaa ggaaaaaatt aacgacaaa acagcaccaa cagatgtcgt tgtccagag 3120  
 ctgatgagg gttatctgaa gcacacgaaa cttttcctt ctttcattca cgcacactac 3180  
 tcttaatga gcaacggtat acggccttcc ttccagttac ttgaattga aataaaaaaa 3240  
 agtttgctgt cttgctatca agtataata gacctgcaat tattaatctt ttgtttcctc 3300  
 gtcattgttc tcttccctt tcttcttgt tctttttct gcacaatatt tcaagctata 3360  
 ccaagcatac aatcaactat ctcatatata atgactcaat tcactgacat tgataagcta 3420  
 gccgttccca cataagaat ttggctgtg gacaccgtat ccaaggccaa ctcaggtcac 3480  
 ccagggtctc cattgggtat ggaccagct gcacacgttc tatggagtca aatgcgcatg 3540  
 aacccaacca acccagactg gatcaacaga gatagatttg tcttgtctaa cggtcacgcg 3600  
 gtcgctttgt tgtattctat gctacatttg actggttacg atctgtctat tgaagacttg 3660  
 aaacagttca gacagtggg ttccagaaca ccaggctatc ctgaatttga gttgccaggt 3720  
 gttgaagtta ctaccgtcc attaggtcaa ggtatctcca acgctgttg tatggccatg 3780  
 gctcaagcta acctggctgc cacttacaac aagccgggct ttaccttgc tgacaactac 3840  
 acctatgtt tcttgggtga cggttgttg caagaagta tttctcaga agcttcctcc 3900  
 ttggctggtc atttgaatt gggttaactg attgccatct acgatgaca caagatcact 3960  
 atcgatgggt ctaccagtat ctattcgat gaagatgtg ctaagagata cgaagcctac 4020  
 ggttgggaag tttgtacgt agaaaatggt aacgaagatc tagccggtat tgccaaggct 4080  
 attgctcaag ctaagtatt caaggacaaa ccaacttga tcaaatgac cacaaccatt 4140  
 ggttacggtt cttgtacgc cggctctcac tctgtcacg gtgccccatt gaaagcagat 4200  
 gatgttaa aactaaagag caaattcggg ttcaaccag acaagctctt tgtgttcca 4260  
 caagaagttt acgaccata ccaaagaca attttaagc cagggtgtga agccaacaac 4320  
 aagtgaaca agttgttcag cgaataccaa aagaattcc cagaattagg tegtgaattg 4380  
 gctagaagat tgagcggcca actaccgca aattgggaat ctaagtgtcc aacttacacc 4440  
 gccaaagact ctgccgtggc cactagaaaa ttatcagaaa ctgttcttga ggatgtttac 4500  
 aatcaattgc cagagttagt tgggtgttct gccgatttaa caccttctaa ctgaccaga 4560  
 tgaaggaag ccttgactt ccaacctct tctccggtt caggtacta ctctgtaga 4620  
 tacattaggt acggtattag agaacacgct atgggtgcca taatgaacgg tatttcagct 4680  
 ttcggtgcca actacaaacc atacggtggt actttctga acttcgttc ttatgtctgt 4740  
 ggtgccgta gattgtccg tttgtctgg caccagtta ttgggttc tacacatgac 4800  
 tctatcggtg tgggtgaaga tggccaaca catcaacct ttgaaactt agcacacttc 4860  
 agatccctac caaacattca agtttgaga ccagctgatg gtaacgaagt ttctccgcc 4920  
 tacaagaact ctttagaat caagcact ccaagtatca ttgcttgc cagacaaaac 4980  
 ttgccaat tggaaggtag ctctattgaa agcgcttcta aggggtgta cgtactaca 5040  
 gatgtgtcta acccagatat tttttagt gctactggt ccgaagtgtc ttgagtgtt 5100  
 gaagctgcta agactttggc cgcaagaac atcaaggctc gtgtgttct tctaccagat 5160

ttcttcactt ttgacaaaca acccctagaa tacagactat cagtcttacc agacaacgtt 5220  
 ccaatcatgt ctgttgaagt ttgggtacc acatgttggg gcaaatacgc tcatcaatcc 5280  
 ttcggtattg acagatttgg tgcctccggt aaggcaccag aagtcttcaa gttcttcggt 5340  
 ttcaccccag aagggtgtgc tgaagagct caaaagacca ttgatttcta taagggtgac 5400  
 aagctaattt ctctttgaa aaaagcttct taaattctga tcgtagatca tcagatttga 5460  
 tatgatatta ttgtgaaaa aatgaataa aactttatac aacttaata caactttttt 5520  
 tataacgat taagcaaaaa aatagtttca aacttttaac aatattcaa acactcagtc 5580  
 cttttcttc ttatattata ggtgtacgta ttatagaaaa atttcaatga ttactttttc 5640  
 tttcttttc ctgtaccag cacatggccg agcttgaatg ttaaaccctt cgagagaatc 5700

acaccattca agtataaagc caataaagaa tatctacca gagaattttg ccatcggaca 5760  
 tgtacctta cgcttatatc tctcattgga atactgtttt ctgattaaaa cacggaagta 5820  
 agaacttaac tcgtttttcg ttgaactatg ttgtgccagc gtaacattaa aaaagagtgt 5880  
 acaaggccac gttctgtcac cgtcagaaaa atatgtcaat gaggaagaa ccgggatggt 5940  
 aacaaaaatc acgatctggg tgggtgtggg tgtattggat tataggaagc cagcgcctca 6000  
 acctggaatt acaggaagct ggtaattttt tgggtttgca atcatcacca tctgcacgtt 6060  
 gttataatgt cccgtgtcta tatatatcca ttgacgggat tctattttt tgctattgaa 6120  
 atgagcgttt ttgttacta caattgggtt tacagacgga attttccta ttgtttcgt 6180  
 cccatttttc cttttctcat tgttctcata tcttaaaaag gtccttttct cataatcaat 6240  
 gcttttttct acttaatat ttacttgcac tcagtgaatt ttaatacata ttctctagt 6300  
 cttgcaaaat cgatttagaa tcaagatacc agcctaataa tggtaaaacc aattatagct 6360  
 cccagtatcc ttgcttctga cttgcccaac ttgggttgcg aatgtcataa ggtcatcaac 6420  
 gccggcgag attggttaca tatcgatgtc atggacggcc attttgttcc aaacattact 6480  
 ctgggccaac caattgttac ctccctacgt cgttctgtgc cagccctgg cgatgctagc 6540  
 aacacagaaa agaagccac tgcgttcttc gattgtcaca tgatggttga aaatcctgaa 6600  
 aaatgggtcg acgattttgc taaatgttgt gctgaccaat ttacgttcca ctacagggcc 6660  
 acacaagacc ctttgcattt agttaagttg attaatgcta agggcatcaa agctgcatgc 6720  
 gccatcaaac ctggtacttc tgttgacgtt ttattgaaac tagctctca tttggatatg 6780  
 gctcttgta tgactgtgga acctgggttt ggaggccaaa aattcatgga agacatgatg 6840  
 ccaaaagtgg aaactttgag agccaagttc cccatttga atatccaagt cgatggttgt 6900  
 ttgggcaagg agaccatccc gaaagccgcc aaagccggtg ccaacgttat tgtcgtgga 6960  
 accagtgttt tcactgcagc tgacccgcac gatgttatct cttcatgaa agaagaagtc 7020  
 tcgaaggaat tgcgttctag agatttgcta gattagtgt acatatgcgg catttctat 7080  
 atttatactc tctatactat acgataggt attttttct cgttttgatc tcctaataa 7140  
 cataaaccca gccattccta ctatacaaga tacgtaagt cctaactcat gggaaaaatg 7200  
 ggccgccag ggtggtgcct tgtccgtttt cgatgatcaa tcctgggat gcagtatcgt 7260

caatgacact ccataaggct tccttaacca aagtcaaaga actcttcttt tcattctctt 7320  
 tcatttctt accgccatct agatcaatat ccatttcgta ccccgcgaa ccgccagata 7380  
 ttcatctact gacgaaaag cgttgaaat aatgacgaaa aagaaggag aaaaaaaag 7440  
 aaaaaaccg ctcttaggcg ggttatctac tgatccgagc ttccactagg atagcaccca 7500  
 aacacctgca tatttgacg acctttactt acaccacca aaaccactt cgcctctccc 7560  
 gccccgata acgtccacta attgagcgat tacctgagcg gtcctctttt gttgcagca 7620  
 tgagacttgc atactgcaa tcgtaagtag caacgtctca aggtcaaac tgtatggaaa 7680  
 ccttgacc tcacttaatt ctactgacc tacctgcaa gtcaaggag ctccgtgatt 7740  
 cctagccacc tcaaggtag cctctcccg gaaactgtg cctttctg cacacatgat 7800  
 ctccagatt tcaacata aatagcttt gataatggca atattaatca aatttattt 7860  
 actctttct tgtaacatct ctctgtaat cccttattcc ttctagctat tttcataaa 7920  
 aaaccaagca actgcttct aacacacaaa cactaaatca aaatggctgc cgggtgccca 7980  
 aaaattgat cgttagaatc ttgggcaat cctttggagg atgccaagag agctgcagca 8040  
 tacagagcag ttgatgaaaa tttaaaatt gatgatcaca aaattattgg aattgtagt 8100  
 ggtagcacag tggtttatgt tgccgaaaga attggacaat attgcatga ccctaaatt 8160  
 tatgaagtag cgtctaaatt catttgcat ccaacaggat tccaatcaag aaacttgatt 8220  
 ttgataaca agttgcaatt aggtccatt gaacagtatc ctgcattga tatagcgtt 8280  
 gacgggtctg atgaagtga tgagaattta caattaatta aagggtgtgg tgctgtcta 8340  
 tttcaagaaa aattggttag tactagtgt aaaacctca ttgtcgttg tgattcaaga 8400  
 aaaaagtac caaaacattt agttaagaac tggaggcaag gtgttccat tgaattgta 8460  
 ccttctcat acgtgagggt caagaatgat ctattagaac aattgcatgc tgaaaaagt 8520  
 gacatcacag aaggagggtc tgctaaagca ggtcctgtt taactgaca taataactc 8580  
 attatcgat cggatttcgg tgaatttcc gatccaagaa aattgcatag agaaatcaa 8640  
 ctgttagtg gcgtgttga aacaggttta ttcacgaca acgttcaaa agcctactc 8700  
 ggtaattctg acggtagtgt tgaagttacc gaaaagtga cagatcaaag gcaaagacag 8760  
 aaaccgtagt aaaggtgac tttcacaac agtgctcca tttttatat tgtattatta 8820  
 aagctatta gttatttga tactgtttt ttccagaag tttctttt agtaaagtac 8880  
 aatccagtaa aatgaagga tgaacaatc gtgtatgcag attcaacacc aataaatgca 8940  
 atgtttatt ctttgaacg ttgtgtgt tcgaaatcca ggataatcct tcaacaagac 9000  
 cctgtccga taaggcgta ctaccgatga cacaccaagc tcgagtaacg gagcaagaat 9060  
 tgaaggatat ttctgacta aatccaaca tcagatttaa tgatccatgg acctggttg 9120  
 atggtaaatt cccactttt gcctgatcca gccagtaaaa tccatactca acgacgatat 9180  
 gaacaaattt cctcattcc gatgctgtat atgtgtataa atttttacat gctctctgt 9240  
 ttagacacag aacagcttta aataaaatgt tggatatact tttctgcct gtggtgcat 9300  
 ccacgctttt aattcatctc ttgtatggt gacaatttg ctattttta acagaacca 9360  
 acggtaatg aaattaaaag ggaacgagt gggggcgatg agtgagtgt actaaaatag 9420

acaccaagag agcaaagcgg tccagcggc gcgaattcg gcgtaatcat ggcatagct 9480  
 gtttctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat 9540  
 aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaagtgt gagtaactc acattaattg cgttgcgctc 9600  
 actccccgt ttcagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg 9660  
 cgcggggaga ggcggtttgc gtattggcg ctcttcgct tctcgctca ctgactcgct 9720  
 gcgctcggtc gttcggtgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt 9780  
 atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 9840  
 caggaaacctg aaaaaggcgg cgttgctggc gttttccat aggctccgcc cccctgacga 9900  
 gcatcacaaa aatcgacgtc caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 9960  
 ccaggcgttt ccccttgaa gctccctgt gcgctctct gttcggacc tgcgcttac 10020  
 cggatacctg tccgcttcc tccctcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg 10080  
 taggtatctc agttcgggt aggtcgttc ctccaagctg ggctgtgtc acgaaccccc 10140  
 cgttcagccc gaccgtcgc cttatccgg taactatctg ctgagtcga acccgtaag 10200  
 acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt 10260  
 aggcgggtgt acagagttt tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt 10320  
 atttggtatc tgcgctcgc tgaagccagt tacctcggg aaaagagttg gtgctcttg 10380  
 atccggcaaa caaaccacc ctggtagcgg tggtttttt gttgcaagc agcagattac 10440  
 gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc ttgatctt tctacgggt ctgacgtca 10500  
 gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac 10560  
 ctgatcctt ttaaatataa atgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac 10620  
 ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaaggacct atctcagca tctgtctatt 10680  
 tcgttatcc atagtgtcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt 10740  
 accatctggc cccagtcgt caatgatacc gcgagacca cgtcaccgg ctccagattt 10800  
 atcagcaata aaccagccag ccggaaggcg cgagcgaga agtggctcct caactttatc 10860  
 cgctctcatc cagtctatta attgttccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa 10920  
 tagtttgcg aacgttgtt ccattgtcac aggcacgtg gtgtcacgt cgtcgtttg 10980  
 tatggcttca ttcagtcgg gttccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt 11040  
 gtgcaaaaa gcggttagct cttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc 11100  
 agtgttatca ctcatgtta tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt 11160  
 aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtc ttctgagaat agtgtatgcg 11220  
 gcgaccgagt tgctctgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac 11280  
 tttaaaagt ctcatcattg gaaaacgtt ttcggggcga aaactctca ggatcttacc 11340  
 gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc aactgatct cagcatcttt 11400  
 tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacagggaagg caaaatgccg caaaaaagg 11460  
 aataaggcgc acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag 11520  
 catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa 11580



acaaataggg gttccgca catttcccg aaaagtgcc cctgacgtca actatacaa 11640  
 tgacaagttc ttgaaaaca gaattctttt attgtcagta ctgattagaa aaactcatcg 11700  
 agcatcaaat gaaactgcaa ttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 11760  
 agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca cggaggcagt tccataggat ggcaagatcc 11820  
 tggatcgggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg 11880  
 tcaaaaaata gggtatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat 11940  
 ggcaaaagct tatgcatttc ttccagact tgtcaacag gccagccatt acgctcgtca 12000  
 tcaaatcac tcgcatcaac caaacggtta ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga 12060  
 aatacgcgat cgctgtttaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgagg 12120  
 aacactgcc gcgcatcaac aatatttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg 12180  
 aatgctgttt tgccggggat cgagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata 12240  
 aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca 12300  
 tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg 12360  
 ggcttccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat 12420  
 ttataccat ataatcagc atccatgttg gaatttaac gcggcctcga aacgtgagtc 12480  
 ttttccttac ccatggtgtt ttatgttcgg atgtgatgtg agaactgtat cctagcaaga 12540  
 ttttaaagg aagtatatga aagaagaacc tcagtggcaa atcctaacct tttatatttc 12600  
 tctacagggg cgccggtgg ggacaattca acgcgactgt gacgcgttct agaacacaca 12660  
 atatgcatgt aatcgctgat ttttttgg ttagaagctc tatcttcagg taaaaatgag 12720  
 tagagaaaa aaaacatact ggatcgatgc agaattaggg ggttattatc ctgcaggtag 12780  
 atgattttca gtgggaacat tgctttttag tagtccggtt ctcaacaact tgtctaagtg 12840  
 ttgaaaaaa aagaaatggc gtagaacaag agtaggttaa gtaaatctgc caatgttcta 12900  
 tgtataaaaa gtaaggcaa gaagaggttc tatgcatatt tctgaaaaa tctaatacac 12960  
 tattataatg catcaagaaa ctgtcgtatg atgaagtccc tatgagtttt tgtgtacgtg 13020  
 ctctctagt atgtagccgg ttttctctt ttacctttt ttactactia tactactact 13080  
 tttactacct ttttccacg taatctagat ctcaagccac aattcttggc ctatgtcca 13140  
 acgtatacaa catgaaagaa gagtctttct ttagggagtc attggaaaag atagtatgat 13200  
 ggtattcgat ttacctatgt cgaaaaagaa agtccggggc aacaccacag aatgctttct 13260  
 ctgtactaat aacctgtgt gcgcttaacg gtctaactgt taatcagcgg tggttaaatt 13320  
 tttgtaaatc taatgttcca tgattttct tctcaaaag gaacatgtag cgaaaatctt 13380  
 tttttactt tgatacactg caattgtttc tgagcatgct gaaattttct cgatgttttt 13440  
 ttttttatt ggcatccaag taattaatcc ttatgtacg aaaaagtgt aggaatgaat 13500  
 catgcataat ctaacggata tcatcatata ctctgtgcta atattctaaa caagttcgaa 13560  
 aatattttct tggccatgt aatagtggt aagtgtattg ctttgatagg aacgtcatta 13620  
 tcgcacaaga caatcgacac taataaccgt taaatatta tcatgcatgt atacatcagt 13680  
 atctcataga aatatacctg taagtacata ctatctaag tataaattct cgacctatgg 13740

agtcaccaca ttccagca acttccac ttctctgca atcgcaacg tctctcttc 13800  
 actgagtctc cgtccgataa cctgcactgc aaccggtgcc ccatggtacg cctccggatc 13860  
 atactcttcc tgcacgagg catcaagctc actaaccgcc ttgaaactct cattctctt 13920  
 atcgtatgtc ttatccgcaa aggtaacgg aacaaccacg ctctgaaat ccagcagggt 13980  
 gatcacagag gcatacccat agtaccggaa ctggtcatgc cgtaccgag cggtaggcgt 14040  
 aatcggcgcg atgatggcgt ccagtctctt cccggcctt tcttcagct cccgccattt 14100  
 ctcaaggtag tccatctggt aattccactt ctggagatgc gtgtcccaga gctcgttcat 14160  
 gttaacagct ttgatgttcg ggttcagtag gtctttgata ttggaatcg ccggctcgcc 14220  
 ggatgcactg atatcgcca ttacgtcggc gctccgtca gccgcgtaga tatgggagat 14280  
 gagatcgtg ccgaaatcg gctgtatgg cgtccacggg gtcacggtgt gaccgcttt 14340  
 ggcgagtgcg gcgacggtgg ttccacgcc gcgcaggata ggagggtgtg gaaggacatt 14400  
 gccgtcgaag ttgtagtagc cgatattgag cccgccgttc ttgatcttg aggcaataat 14460  
 gtccgactcg gactgggcc agggcatggg gatgacctg gactcgtatt tccatggctc 14520  
 ctgaccgagg acggatttgg tgaaggaggc gaggtctca acagagtgcg taatcgcccc 14580  
 gacaacgtg tgcaccgtc cctgaccctc catgctgttc gccatcttg catacggcag 14640  
 ccgccatga ctggcccta gaccgtacag gaagtgaac gcggccgcca ctgcaatcga 14700  
 gccaccgata tccgttcta caccgatgac gccaccaga atccaacga tcgaccctc 14760  
 accaccagaa ctgccgccg acgaccagtt cttgtgcgt gggttgacgg tgcgccgat 14820  
 gatgttgtg actgtctcg agaccatcag ggtctcggg acagaggtct tgacgtagaa 14880  
 gacggcaccg gctttcgga gcatggtgt cagaaccgag tcccttcgt cgtactgtt 14940  
 tagccatgag atgtagccca ttgatgttc gtagccctg actgaagct ggtcttgag 15000  
 agagatgggg agggcatgga gtggaccaac gggctcttg tctttgcgt agtattcatc 15060  
 gaggctcctt gcctgcgca gagcgcgctc agggagaac tcgtgggcgc agtttggtaa 15120  
 ctgtgggcg attgctccc gtttacgaa tgctagcga acttcaccg aggtcaactc 15180  
 tccggccgcg agcttgaca caagatctgc agcgaggcc tctgtatct tcagttcggc 15240  
 ctctgaaagg atccccgatt tctttgggaa atcaataacg ctgtctccg caggcagcgt 15300  
 ctggactttc cattcatcag ggatggttt tgcgaggcgg gcgcgcttat cagcgccag 15360  
 ttctcccag gattaggcca ttgtatatga gatagttgat tgtatgctg gtatagcttg 15420  
 aaatattgtg cagaaaaaga aacaaggaag aaagggaacg agaacaatga cgaggaaaca 15480  
 aaagattaat aattgcaggt ctatttatac ttgatagcaa agcgcaaac ttttttatt 15540  
 tcaaatcaaa gtaactggaa ggaaggccgt ataccgttg tcattagaga gtagtgtcg 15600  
 tgaatgaagg aaggaaaaag ttctgtgtg tcgaagata ccctcatcag ctctggaaca 15660  
 acgacatctg ttggtgctgt cttgtcgtt aatttttcc tttagtgtt tccatcattt 15720  
 tttttgcat tgcgatatg gtgagacaac aacgggggag agagaaaaga aaaaaaaga 15780  
 aaagaagtgt catgcgcta ttattacttc aatagatggc aaatggaaa agggtagtga 15840  
 aacttcgata tgatgatggc tatcaagtct agggctacag tattagttc ttatgtacca 15900

ccatcaatga ggcagtgtaa ttgtgtagt ctgttttagc ccattatgtc ttgtctggta 15960  
 tctgttctat tgtatatctc cctccgccca cctacatgtt agggagacca acgaaggat 16020  
 tataggaatc ccgatgtatg ggtttggttg ccagaaaaga ggaagtccat attgtacacc 16080  
 cggaacaac aaaaggatgg gcccatgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa 16140  
 cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtc 16176

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 5

gaaatgggcg cattactaca ag 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 6

сaccaacctg atgggttcct ag 22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 7

acgccagggt ttcccagtc ac 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 8

ссagсaccct aagccgacta gg 22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 9

acggtgctga tgaagtggat g 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 10

accacgссса cтаacagtтt g 21

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 11

gggggtacc ctggatggcg gcgttagtat cg 32

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Штучні послідовності  
 <220>  
 <223> Штучний DNA  
 <400> 12  
 ggggggtacc tcacagtcgc gttgaattgt cc 32

<210> 13  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Штучні послідовності  
 <220>  
 <223> Штучний DNA  
 <400> 13  
 ccaaggcagc ggtacatcaa gtag 24

<210> 14  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Штучні послідовності  
 <220>  
 <223> Штучний DNA  
 <400> 14  
 tgcacatggt gtccatcaag atg 23

<210> 15  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Штучні послідовності  
 <220>  
 <223> Штучний DNA  
 <400> 15  
 ggaaacagct atgacatgat tacg 24

<210> 16  
 <211> 23  
 <212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 16

gtagcgaat catgtattgc acc

23

<210> 17

<211> 18215

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 17

```

ggccaagatg gccgatctgc atttttcata ataactctcg gtactttcta caagatcaat   60
taaattccaa tcaaaaatcg tcttttgcaa gattttgaag tcacagtact tttcattttc  120
aatgtcaaca gcgccccatt tgtattgtct tcctttaact ttttcgcct tttcattaaa  180
aatgtactca ttagatgcaa ttatactgaa tggatatttt tgaaaaatat cttgtgttgc  240
attcaaaact tcacgcccga aaaagaaaca tacagggata tctgtactc ttattatttc  300
tctaacttgt gttttgaagt ttttcaattc ctcttcgtt agcaaatctg atttagcaat  360
aaccgggatt aaattcactc tcttcgctaa tttttcatt gttacgacgt ctaaagtatc  420
aattccctta ttgaaggtc tcagaaagta caaacaacaa tggactctat tatcaaccat  480
ttttgtccta tcagggtgtt ctcttgga aatgtacgat cttatttctt catcaatata  540
gtttctagac tgcagcccg gatccgtcga caagcttggt gagagggtgac ttcatgaacc  600
aagtgtctgt cgatatacaa caaaaaggaa ccattttcat ctgatggac aacatgtgca  660
tcaaaaacct tatcgtaaag agttcttgga cccttgatg gagtgtaaac catgatttaa  720
aacagcaaat aataaaaatc gatagcgaca aaaactgtca atttcaatat tctttatatt  780
tgttgactgc ttagatattt tgagaaaatt cagcggaac agcgtgatga gtgagttaag  840
ttctgctgtt taaataagta ttcaactact attgaagccg actcatgaag ccggttacgg  900
acaaaaccgg gcaaatctcg ccggtcccgg aattttcgtt tccgaataa aagaaccgct  960
catcatcata gcgccagggt agtatactat agaaggtcag actaaactga gtcactaga  1020
gtaatgacgc cttagtagct tttacatctt cataagaaaa ggaaacttgt agaatggcct  1080
ggcgatttgt ttgctttctt gtgatgaaga aatttcgatg cgattaaccg gcaaaatcag  1140
taaaggattt tcgcgagggc ggccttcaat catcgaatac tacgtcttaa tatgatgtac  1200
tgtggttcat attttcaagt agtgtagta aatttgata cgttcatga agtgtgtatc  1260
ttgagtgtct gtatggcgcg ataaacgtaa gcgagacttc caaatggagc aaacgagaag  1320
agatctttaa agtattatag aagagctggg caggaaactat tatgacgtaa agccttgacc  1380

```

ataataaaga cgattcttgg tccctctata caaacatctt gcaaagatac caaatatttt 1440  
 caaatcctac tcaataaaaa attaatgaat aaattagtggt gtgtgcatta tatatattaa 1500  
 aaattaagaa ttgactaaa taaagtgttt ctaaaaaaat attaaagttg aaatgtgcgt 1560  
 gttgtgaatt gtgctctatt agaataatta tgactgtgtg gcgtttcata ttttaaaata 1620  
 ggaaataacc aagaaagaaa aagtaccatc cagagaaacc aattatatca aatcaaataa 1680  
 aacaaccagc ttcggtgtgt gtgtgtgtgt gaagctaaga gttgatgcca tttaatctaa 1740  
 aaattttaag gtgtgtgtgt ggataaaata ttagaatgac aattcgaatt gcgtacccta 1800  
 gtcaaaaaat tagcctttta attctgtgtg aaccctgaca tgcccaaaat agggggcgagg 1860  
 ttacacagaa tatataacat cgtaggtgtc tgggtgaaca gtttattcct ggcatccact 1920  
 aaatataatg gagcccgttt ttaagctgg catccagaaa aaaaaagaat cccagcacca 1980  
 aaatattgtt ttttcacca accatcagtt cataggtcca tttcttagc gcaactacag 2040  
 agaacagggg cacaacagg caaaaaacgg gcacaacctc aatggagtga tgcaacctgc 2100  
 ctggagtaaa tgatgacaca aggcaattga cccacgatg tatctatctc attttcttac 2160  
 accttctatt accttctgct ctctctgatt tggaaaaagc tgaaaaaaaa ggttgaacc 2220  
 agttccctga aattattccc ctacttgact aataagtata taaagcggg aggtattgat 2280  
 tgtaattctg taaatctatt tcttaaaact cttaaattct acttttatag ttagtctttt 2340  
 ttttagtttt aaaaacacaa gaacttagtt tcgaataaac acacataaac aaacaaaatg 2400  
 ttatcagtag ctgattatga gttttggtt gttaccggtt cacaacacct ttatggtgaa 2460  
 gaacaattga agtctgttgc taaggatgag caagatatg cggataaatt gaatgcaagc 2520  
 ggcaagttac cttataaagt agtctttaag gatgttatga cgacggctga aagtatcacc 2580  
 aactttatga aagaagttaa ttacaatgat aaggtagcgg gtgttattac ttgatgcac 2640  
 acattctcac cagctaagaa ctggattcgt ggaactgaac tgttcaaaa accattatta 2700  
 cacttagcaa cgcaatattt gaataatatt ccatatgcag acattgactt tgattacatg 2760  
 aaccttaacc aaagtgcaca tggcgaccgc gagtatgcct acattaacgc ccggttgacg 2820  
 aaacataata agattgttta cggctattgg ggcgatgaag atgtgcaaga gcagattgca 2880  
 cgttggaag acgtcgcctg agcgtacaat gagagcttta aagttaaggt tgctcgttt 2940  
 ggcgacacaa tgcgtaattg ggccgttact gaaggtagca aggttgaggc tcaaatgaag 3000  
 atgggctgga cagttgacta ttatggtatc ggtgacttag ttgaagagat caataagggt 3060  
 tcggatgctg atgttgataa ggaatacgt gacttgaggt ctggtatga aatggtccaa 3120  
 ggtgataacg atgcggacac gtataaacat tcagttcggg ttcaattggc acaatatctg 3180  
 ggtattaagc ggttcttaga aagaggcggg tacacagcct ttaccagaa ctttgaagat 3240  
 ctttggggga tggagcaatt acctggtcta gttcacaat tattaattcg tgatgggtat 3300  
 ggttttgggt ctgaaggta ctggaagacg gctgcttag gacgggttat gaagattatg 3360  
 tctcacaaca agcaaaccgc cttatggaa gactacaggt tagacttgcg tcatggtcat 3420  
 gaagcgatct taggttcaca catgttgaa gttgatccgt ctatcgcaag tgataaacca 3480  
 cgggtcgaag ttcatccatt ggatattggg ggtaaagatg atcctgctcg ctagtatttt 3540

actggttcag aaggtgaagc aattgatgtc accgttgccg atttccgtga tgggttcaag 3600  
 atgattagct acgcggtaga tgcgaataag ccagaagccg aaacacctaa ttaccagtt 3660  
 gctaagcaat tatggacccc aaagatgggc ttaaagaaag gtgcactaga atggatgcaa 3720  
 gctgggtggg gtcaccacac gatgctgtcc ttctcgttaa ctgaagaaca aatggaagac 3780  
 tatgcaacca tggttggcat gactaaggca ttcttaaagt aagtgaattt actttaaatc 3840  
 ttgcatttaa ataaattttc tttttatagc tttatgactt agtttcaatt tatatactat 3900  
 tttaatgaca ttttcgattc attgattgaa agctttgtgt tttttcttga tgcgtattg 3960  
 cattgttctt gcttttttcg ccacatgtaa tatctgtagt agatactga tacattgtgg 4020  
 atgctgagtg aaattttagt taataatgga ggcgtcttta ataattttgg ggatattggc 4080  
 tttttttt aaagtttaca aatgaatttt ttccgccagg atcgtagcc gcggaaccgc 4140  
 cagatattca ttacttgacg caaaagcgtt tgaaataatg acgaaaaaga aggaagaaaa 4200  
 aaaaagaaaa ataccgcttc taggcgggtt atctactgat ccgagcttcc actaggatag 4260  
 caccacaaca cctgcatatt tggacgacct ttacttacac caccaaaaac cactttcgcc 4320  
 tctccgcccc ctgataacgt ccactaattg agcgattacc tgagcgtcc tctttgttt 4380  
 gcagcatgag acttgcatac tgcaaatcgt aagtagcaac gtctcaaggt caaaactgta 4440  
 tggaaacctt gtcacctcac ttaattctag ctacgtacc ctgcaagtca agaggtctcc 4500  
 gtgattccta gccacctcaa ggtatgcctc tcccggaaa ctgtggcctt ttctggcaca 4560  
 catgatctcc acgatttcaa catataata gcttttgata atggcaatat taatcaaatt 4620  
 tattttactt cttttctgta acatctctct tgtaatccct tattccttct agctattttt 4680  
 cataaaaaac caagcaactg cttatcaaca cacaacact aaatcaaat gaatttagtt 4740  
 gaaacagccc aagcgattaa aactggcaaa gtttcttag gaattgagct tggctcaact 4800  
 cgaattaaag ccgttttgat cacggacgat ttaatacga ttgcttcggg aagttacgtt 4860  
 tgggaaaacc aatttgtga tgggtactgg acttacgcac ttgaagatgt ctggaccgga 4920  
 attcaacaaa gttatacgca attagcagca gatgtccga gtaaatatca catgagtttg 4980  
 aagcatatca atgctattgg cattagtgcc atgatgcacg gatacctagc atttgatcaa 5040  
 caagcgaat tattagtcc gtttcggact tggcgttaata acattacggg gcaagcagca 5100  
 gatgaattga ccgaattatt tgatttcaac attccacaac ggtggagtat cgcacactta 5160  
 taccaggcaa tcttaataa tgaagcgac gttaaacagg tggacttcat aacaacgctg 5220  
 gctggctatg taacctggaa attgtcgggt gagaaagttc taggaatcgg tgatgcgtct 5280  
 ggcgttttcc caattgatga aacgactgac acatacaatc agacgatgtt aaccaagttt 5340  
 agccaacttg acaaagttaa accgtattca tgggatatcc ggcatatttt accgcgggtt 5400  
 ttaccagcgg gagccattgc tggaaagtta acgctgccg gggcgagctt acttgatcag 5460  
 agcggcacgc tcgacgctgg cagtgttatt gcaccgcag aaggggatgc tggacagga 5520  
 atggtcggtta cgaacgcgt ccgtaaacgc acgggtaaca tctcgtggg aacctcagca 5580  
 ttttcgatga acgttctaga taaaccattg tctaaagtct atcgcatat tgatattgtt 5640  
 atgacgccag atgggtcacc agttgcaatg gtgatgtta ataattgttc atcagatatt 5700



aatgcgtggg caacgatttt tcatgagttt gcagcccggg tgggaatgga attgaaaccg 5760  
gatcgattat atgaaacgtt attcttggaa tcaactcgcg ctgatgcgga tgctggaggg 5820  
ttggctaatt atagttatca atccggtgag aatattacta agattcaagc tggtcggccg 5880  
ctatttgtac ggacacaaaa cagtaaatgt agtttaccga actttatgt gactcaatta 5940  
tatcgggcgt tcgacccctt ccaacttggg atggatatc ttgtaacga agaacatgtt 6000  
caaacggacg ttatgattgc acaggggtgga ttgtccgaa cgccgtaat tggccaacaa 6060  
gtattggcca acgactgaa cattccgatt actgtaatga gtactgctgg tgaaggcggc 6120  
ccatggggga tggcagtgtt agccaacttt gcttgcggc aaactgcaat gaacctagaa 6180  
gatttcttag atcaagaagt ctttaaagag ccagaaagta tgacgttgag tccagaaccg 6240  
gaacgggtgg ccgatatcgc tgaatttatt caacgttatc aagctggctt accagttgaa 6300  
gcacggcgtg ggcaagcaat caaatattag agcttttgat taagccttct agtcaaaaa 6360  
acacgttttt ttgtcattta ttcattttc ttagaatagt ttagttatt cattttatag 6420  
tcacgaatgt tttatgattc tatatagggt tgcaacaag catttttcat tttatgttaa 6480  
aacaattca ggtttacctt ttattctgct tgtggtgacg cgggtatccg cccgtcttt 6540  
tggtcacca tgtatttaat tgcataata attcttaaaa gtggagctag tctatttcta 6600  
ttacatacc tctcatttct catttctcc actagtagag aattttgcca tcggacatgc 6660  
tacctacgc ttatatctct cattggaata tcgttttctg attaaaacac ggaagtaaga 6720  
acttaattcg tttttcttg aactatgttg tgccagcgta acattaaaaa agagtgtaca 6780  
aggccacgtt ctgtaccgtg cagaaaaata tgcataagag gcaagaaccg ggatggtaac 6840  
aaaaatcacg atctgggtgg gtgtgggtgt attggattat aggaagccac gcgtcaacc 6900  
tggaattaca ggaagctggt aattttttgg gtttgaatc atcacatct gcacgttgtt 6960  
ataatgtccc gtgtctatat atatccattg acggtattct attttttgc tattgaaatg 7020  
agcgtttttt gttactacaa ttggttttac agacggaatt ttccctattt gtttctccc 7080  
atttttcttt ttctcattgt tctcatatct taaaaaggtc ctttctcat aatcaatgct 7140  
ttcttttact taatatttta ctgcatcca gtgaatttta atacatattc ctctagtctt 7200  
gcaaaatcga tttagaatca agataccagc ctaaaatgc tagaagcatt aaaacaagaa 7260  
gtttatgagg ctaacatgca gcttcaaag ctgggcctgg ttacttttac ctggggcaat 7320  
gtctcgggca ttgaccggga aaaaggccta ttctgatca agccatctgg tgttgattat 7380  
ggtgaattaa aaccaagcga tttagtcgtt gtaacttac aggggtgaagt ggttgaaggt 7440  
aaactaaatc cgtctagtga tacgccgact catacggtgt tatataacgc ttttctaatt 7500  
attggcggaa ttgtccatac tcattcgcca tgggcagttg cctatgcagc tgctcaaatg 7560  
gatgtgccag ctatgaacac gacctatgct gatacgttct atggtgacgt gccggccgcg 7620  
gatgcgctga ctaaggaaga aattgaagca gattatgaag gcaacacggg taaaaccatt 7680  
gtgaagacgt tccaagaacg gggcctcgat tatgaagctg taccagctc attagtcagc 7740  
cagcacggcc catttcttg gggaccaacg ccagctaaag ccgtttacaa tgctaaagt 7800  
ttggaagtgg ttccgaaga agattatcat actgcgcaat tgaccgtgc aagtagcgaa 7860

ttaccacaat atttattaga taagcattat ttacgtaagc atgggtgaag tgcctattat 7920  
 ggtcaaaaa atgcgcattc taaggatcat gcagttcgca agtaaaaaa tcgctcttaa 7980  
 atatatact aaagaacatt aaagctatat tataagcaaa gatacgtaaa ttttcttat 8040  
 attattatac acatatcata tttctatat ttttaagattt gggtatataa tgtacgtaat 8100  
 gcaaaggaaa taaattttat acattattga acagcgtcca agtaactaca ttatgtgcac 8160  
 taatagtta gcgctgtgaa gactttattg tgcgcgaaa agtaaaaatt ttaaaaatta 8220  
 gagcaccttg aacttgcgaa aaagggtctc atcaactgtt taaaaacgcg tgcctctgt 8280  
 gtttcagttc agggcttttc ggaggatgtg aatcgacggc gtaactgtct tgggaacttt 8340  
 gttcactgat tttcactcc tcagcgaatc cagagactat ctgggaaat tcgacaggac 8400  
 agtctgttga caaccgactc ccttttgact tcataataaa aattcaatga cgcaaaagga 8460  
 attttagggtt tttattttt atttatttat ttctgttaat tgatcctttt ctttcacta 8520  
 ccaacaacaa aaaagggggg aaaaagatgt ataactaaa agacactaat ctgctcttga 8580  
 tatccttatt atgtaattga ataactcata taaatgtaaa atagaacttc aaattaatat 8640  
 tataatgata gtcgaggtca gacacactta taatacatta agtaagaaaa aaaaaatgtc 8700  
 tgtcatcgag gtcctttttg tgcgctaac aaaacatcac taaatacgaa gacactttgc 8760  
 atgggaagga tgcagcaaat ggcaaaactaa cgggccattg attggtttac ctctctatt 8820  
 tgtattacga ccagaaagaa cgaatgggtt tcatcaatga ggtaggaac gacctaaata 8880  
 taatgtagca tagataaaat cttgtactg tatggttga atgccttctt gattagtatc 8940  
 gaatttcttg aataattttg ttaatctcat tagccaaact aacgcctcaa cgaatttatt 9000  
 aaactttagt tcttttctg ttccatttct gtttataaac tcagcatatt ggtcaaatgt 9060  
 tttctcgcta acttcaaaaag gtattagata tcctagtctt tgaagtgaat tatgaaattc 9120  
 gcttacagaa atggtagcgc atccgttgat atcattgtcc acataaactt ttctccaact 9180  
 tttcactctt ttgtataggc cgatgaattc tgcctggtg acagtccaa acctggaagc 9240  
 accaaataaa ttatcagcg catctactga tgatatacaa aaatgggagt tgcgtcgtt 9300  
 ttgtagtaag ttctgtagtt cctcagctgt cagtcgggtt ttgcccttta catcatggtt 9360  
 atgaaatagc tgtgtggcca cttgcatgtc tcgtacatct tctctgctat cgaacgaagc 9420  
 aggtgcaact ttctcaaga gttgtgcagg cactgcttga ttgtgaatta ggggaggagg 9480  
 agagggaagct atccgttgag cggaagtgtt caagtgtta taatgggttg gcgctggagg 9540  
 tataggcctg cctgctggtt tctgtcgat aacattatat ctaggatcca cagggttttt 9600  
 cgtatgtctt ggagaataac ttggggaga accataggag tggtagcgtt tttctgctct 9660  
 gttttgtta tattagttt gtaagggaat tggagctgag tggactctag tgttgggagt 9720  
 ttgtgcttga gtaaccgta ccacggctcc tcgctgcaga cctgcgagca gggaacgct 9780  
 cccctcacag tcgcttgtaa ttgtccccc gccgcgccc ttagagaaaa tataaaaggt 9840  
 taggatttgc cactgaggtt cttctttcat atacttctt ttaaaatctt gctaggatac 9900  
 agttctaca tcacatcca acataaaca ccatgggtaa ggaaaagact caggtttcga 9960  
 ggccgcgatt aaattccaac atgtagctg atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata 10020

atgtcgggca atcagggtcg acaatctatc gattgtatgg gaagcccgat gcgccagagt 10080  
 tgtttctgaa acatggcaaa ggtagcgttg ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac 10140  
 taaactggct gacggaattt atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc cgtactctcg 10200  
 atgatgcatg gttactcacc actgcgatcc ccggcaaaac agcattccag gtattagaag 10260  
 aatatcctga ttcaggtgaa aatattgttg atgcgctggc agtgttctcg cgccgggttc 10320  
 attcgattcc tgtttgtaat tgcctttta acagcgatcg cgtatttcgt ctgctcagg 10380  
 cgcaatcacg aatgaataac ggtttggttg atgcgagtga tttgatgac gagcgtaatg 10440  
 gctggcctgt tgaacaagtc tggaaagaaa tgcataagct ttgccattc tcaccggatt 10500  
 cagtcgtcac tcatggtgat ttctcacttg ataaccttat tttgacgag gggaaattaa 10560  
 taggttgatg tgatgttga cgagtcggaa tcgcagaccg ataccaggat ctgccatcc 10620  
 tatggaactg cctcgttgag ttttctctt cattacagaa acggctttt caaaaatag 10680  
 gtattgataa tcctgatatg aataaattgc agtttcattt gatgctcgat gagttttct 10740  
 aatcagtact gacaataaaa agattcttgt ttcaagaac ttgtcattg tatagtttt 10800  
 ttatatgta gttgtctat ttaatacaaa tgttagcgtg atttatatt ttttcgct 10860  
 cgacatcatc tgcccagatg cgaagttaag tgcgcagaaa gtaatatcat gcgtcaatcg 10920  
 tatgtgaatg ctggctgcta tactgctgtc gattcgatac taacgccgcc atccagggtg 10980  
 ccactctttt gttgtttccg ggtgtacaat atggacttcc tctttctgg caaccaaac 11040  
 catacatcgg gattcctata atacctctgt tggctcctt aacatgtagg tggcggagg 11100  
 gagatataca atagaacaga taccagacaa gacataatgg gctaaacaag actacaccaa 11160  
 ttactctgcc tcattgatgg tggtagataa cgaactaata ctgtagcctt agacttgata 11220  
 gccatcatca tatgaagtt tcactaccct ttttcattt gccatctatt gaagtaataa 11280  
 taggcgcatg caactctttt tctttttt tctttctct cccccggt gttgtctac 11340  
 catatccgca atgacaaaaa aatgatgga agacactaaa ggaaaaaatt aacgacaaag 11400  
 acagcaccaa catggtcgtg tgtccagag ctgatgagg gttatcttca acacacgaaa 11460  
 cttttcctt ccttcattca cgcacactac tctctaata gcaacggtat acggccttc 11520  
 ttccagttac tgaatttga aataaaaaa gttgccgct ttgctatcaa gtataaatag 11580  
 acctgcaatt attaatcttt ttttctctg tcattgttct cgttccttt cttcttgtt 11640  
 tcttttctg cacaatattt caagctatac caagcataca atcaactatc tcatatacaa 11700  
 tgcctcaatc ctgggaagaa ctggccgctg ataagcgcgc ccgcctcgca aaaaccatcc 11760  
 ctgatgaatg gaaagtccag acgctgcctg cggaagacag cgttattgat ttccaaaga 11820  
 aatcggggat ccttcagag gccgaactga agatcacaga ggctccgct cgagatcttg 11880  
 tgtccaagct ggccggccga gagttgacct cgggtggaagt tacgctagca ttctgtaaac 11940  
 gggcagcaat cggccagcag ttaacaaact gcgccacga gttcttcct gacgccgctc 12000  
 tcgcgaggc aagggaactc gatgaatact acgcaaagca caagagacc gttggtccac 12060  
 tccatggcct cccatctct ctcaaagacc agcttcgagt caaggctac gaaacatcaa 12120  
 tgggctacat ctcatggcta aacaagtacg acgaaggga ctcggttctg acaacctgc 12180

tccgcaaagc cgggtgccgtc ttctacgtca agacctctgt cccgcagacc ctgatggtct 12240  
 gcgagacagt caacaacatc atcgggcgca ccgtcaaccc acgcaacaag aactggctgt 12300  
 gggggcgagc ttctgggtgt gaggggtcga tcgttgggat tcgtgggtggc gtcacgggtg 12360  
 taggaacgga tatcggtggc tcgattcgag tgcgggccc gttcaacttc ctgtacggtc 12420  
 taaggccgag tcattggcgg ctgccgtatg caaagatggc gaacagcatg gagggtcagg 12480  
 agacggtgca cagcgttgtc gggccgatta cgcactctgt tggaggacct cgcctcttca 12540  
 ccaaatccgt cctcggtcag gagccatgga aatacgactc caaggtcatc cccatgccct 12600  
 ggcgccagtc cagtcggac attattgcct ccaagatcaa gaacggcggg ctcaatatcg 12660  
 gctactacaa cttcgagcgc aatgtccttc cacacctcc tatctgcgc ggcgtggaaa 12720  
 ccaccgtcgc cgcactcgc aaagccggtc acaccgtgac cccgtggacg ccatacaagc 12780  
 acgatttcgg ccacgatctc atctccata tctacggcg tgacggcagc gccgacgtaa 12840  
 tgcgcgatat cagtgcaccc ggcgagccgg cgattccaaa tatcaagac ctactgaacc 12900  
 cgaacatcaa agctgttaac atgaacgagc tctgggacac gcatctccag aagtgaatt 12960  
 accagatgga gtaccttgag aaatggcggg aggcgtgaaga aaaggccggg aaggaactgg 13020  
 acgccatcat cgcgccgatt acgcctaccg ctgcggtacg gcatgaccag ttccggtact 13080  
 atgggtatgc ctctgtgatc aacctgctgg atttcacgag cgtggtgtt ccggttacct 13140  
 ttgcggataa gaacatcgat aagaagaatg agagtttcaa ggcggttagt gagcttgatg 13200  
 ccctcgtgca ggaagagtat gatccggagg cgtaccatgg ggcaccggtt gcagtgcagg 13260  
 ttatcggacg gagactcagt gaagagagga cgttggcgat tgacagaggaa gtggggaagt 13320  
 tgctgggaaa tgggtgact ccataggtcg agaatttata ctagataag tatgtactta 13380  
 caggtatatt tctatgagat actgatgtat acatgcatga taatatttaa acggttatta 13440  
 gtgccgattg tcttgtcga taatgacgtt cctatcaaa caatacactt accacctatt 13500  
 acatgggcca agaaaatatt ttcgaacttg tttagaatat tagcacagag tatatgatga 13560  
 tatccgttag attatgatg attcattctt acaactttt cgtagcataa ggattaatta 13620  
 ctggatgcc aataaaaaaa aaaaacatcg agaaaattc agcatgctca gaaacaattg 13680  
 cagtgtatca aagtaaaaaa aagattttcg ctacatgttc cttttgaaga aagaaaatca 13740  
 tggaacatta gatttataaa aatttaacca ccgctgatta acgattagac cgtaaagcgc 13800  
 acaacagggt attagtacag agaaagcatt ctgtgggtgt gccccgact ttcttttgcg 13860  
 acataggtaa atcgaatacc atcactatct cttttcaat gactccctaa agaaagactc 13920  
 ttcttcgatg ttgtatcgt tggagcatag ggcaagaatt gtggcttgag atctagatta 13980  
 cgtggaagaa aggtagtaaa agtagtagta taagtagtaa aaagagtaa aaagagaaaa 14040  
 ccggctacat actagagaag cagctacaca aaaactcata ggcaattcat catacgacag 14100  
 ttcttgatg cattataata gtgtattaga tatttcaga aatatcata gaacctcttc 14160  
 ttgcctttac tttttataca tagaacattg gcagatttac ttacactact ttgtttctac 14220  
 gccatttctt ttgttttcaa cacttagaca agttgttgag aaccggacta ctaaaaagca 14280  
 atgttccac tgaataatcat gtacctgcag gataataacc ccctaattct gcatcgatcc 14340

agtatgtttt tttttctcta ctcattttta cctgaagata gagcttctaa aacaaaaaaa 14400  
 atcagcggatt acatgcatat tgtgtgttct agaattgcgg atcaccagat cgccattaca 14460  
 atgtatgcag gcaaatatct ctcagaatga aaaatagaga aaaggaaacg aaaattctgt 14520  
 aagatgcctt cgaagagatt tctcgatatg caaggcgtgc atcagggtga tccaaaggaa 14580  
 ctcgagagag agggcgaaag gcaatttaac gcattgcttc tccattgact tctagttag 14640  
 cggataagtt cggaaatgta agtcacagct aatgacaaat ccacttagg ttcgaggca 14700  
 ctatttaggc aaaaagacga gtggggaaat aacaaacgct caaacatatt agcatatacc 14760  
 ttcaaaaaat gggaatagta tataaccttc cggttcgta ataatcaaa tcttcatct 14820  
 agttctcta agatttcaat atttgcctt ctgaagaaa gaatctact tctcccca 14880  
 ttcgactgc aaagtagct tggcactggc cgtcgttta caacgtcgt actgggaaaa 14940  
 ccttgcctt cccaactta atgccttgc agcacatccc ctttcgcca gctggcgtaa 15000  
 tagcgaagag ccccgaccg atcccttc ccaacagtg cgcagcctga atggcgaatg 15060  
 ggaaattga aacgttaata tttgttaaa attcgcgtta aattttgtt aaatcagctc 15120  
 atttttaac caataggccg aaatcgcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 15180  
 gatagggttg agtgtgttc cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 15240  
 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 15300  
 ctaatcaagt ttttgggtg cgaggtgccc taaagcacta aatcgaacc taaaggag 15360  
 ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgacgtg cgcgaaagg aagggaagaa 15420  
 agcgaaagga gcggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac 15480  
 cacaccgcg gcccttaag cgccgctaca gggcgctga ggtggcactt ttcgggaaa 15540  
 tgtgcgga accctattt gttttttt ctaatacat tcaaatatg atccgctcat 15600  
 gagacaataa ccctgataaa tgcttaata atattgaaa aggaagagta tgagtattca 15660  
 acatttcgt gtcgcccta ttcctttt tgcggcattt tgccttctg ttttgcctca 15720  
 cccgaaacg ctgtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 15780  
 catcgaactg gatcacaaca gcggaagat ccttgagagt ttcgccccg aagaacgttt 15840  
 tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc 15900  
 cgggcaagac caactcggc gccgcataca ctattctcag aatgacttg ttgagtactc 15960  
 accagtaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctc 16020  
 cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttactctg acaacgatc gaggaccgaa 16080  
 ggagctaacc gctttttgc acaacatggg ggatcatgta actgccttg atcgttggga 16140  
 accggagctg aatgaagcca taccaaagca cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat 16200  
 ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt agtctagctt cccgcaaca 16260  
 attaatagac tggatggagg cgataaagt tgcaggacca cttctgcgt cgcccttc 16320  
 ggctggctgg tttattctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat 16380  
 tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 16440  
 tcaggcaact atgtagaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa 16500

gcattggttaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca 16560  
 tttttaattt aaaaggtatc aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc 16620  
 ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 16680  
 ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 16740  
 agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accacctctt tttccgaagg taactggctt 16800  
 cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagttag ccgtagttag gccaccactt 16860  
 caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 16920  
 tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 16980  
 ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac 17040  
 ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa agcggccacgc tccccgaagg 17100  
 gaaaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc gcacgaggga 17160  
 gctccaggcg ggaacgcct ggtatcttta tagtctctgc gggtttcgcc acctctgact 17220  
 tgagcgtcga ttttttgat gctcgtcagg gggcgaggc ctatgaaaa acgccagcaa 17280  
 cgcggccttt ttacggttcc tggcctttg ctggcctttt gctcacatgt tcttctctgc 17340  
 gttatccctt gattctgtgg ataaccgat taccgccttt gagtgcgctg ataccgctcg 17400  
 ccgcagccga acgaccgagc gcagcagtc agtgagcggg gaagcggaag agcgcccaat 17460  
 acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgccc gattcattaa tgacgtggc acgacaggtt 17520  
 tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc tcaactatta 17580  
 ggcaccccg gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtgaa ttgtgagcgg 17640  
 ataacaattt cacacaggaa acagctatga catgattacg aatttaatac gactcacaat 17700  
 aggggaattag ctgacgcgaa attattggct tttttttt tttaattaat actacctttt 17760  
 gatgtgaacg ttactaaag tagcactatc tgtggaatgg ctgttgaac ttttccgat 17820  
 taacagcttg tattccaagt cctgacattc cagttgtaag tttccaact tgtgattcaa 17880  
 ttgttcaatc tcttggttaa aattctcttg ttccatgaat aggcctttt tccagtctcg 17940  
 aaattttgaa atttctctgt tggacagctc gttgaatttt ttcttagctt ctaattgtct 18000  
 agttataaat tcaggatccc attctgtagc caccttatcc atgaccgttt tattaattat 18060  
 ttcatagcac ttgtaatttt tgagtttgtt ttctcgatt tcatgaagt tcatttcttc 18120  
 ctccaaaaat ttcctttgtt ctccgttat gtcaacactt ttcgttgta agcaatctct 18180  
 ggcctttaat agcctagttc ttagcatttc agatc 18215

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Штучні послідовності

<220>

<223> Штучний DNA

<400> 18  
tgatcttgta gaaagtaccg agg 23

<210> 19  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Штучні послідовності  
<220>  
<223> Штучний DNA  
<400> 19  
ctttgttctt ccgttatgtc аасас 25

<210> 20  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Штучні послідовності  
<220>  
<223> Штучний DNA  
<400> 20  
ttccaagaag аасаасctga tag 23

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Штучні послідовності  
<220>  
<223> Штучний DNA  
<400> 21  
tgatgtgaac gtttactaaa g 21

<210> 22  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Штучні послідовності  
<220>  
<223> Штучний DNA

&lt;400&gt; 22

tggtcttctt ggaaatgta cg

22

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Штучні послідовності

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Штучний DNA

&lt;400&gt; 23

gattcgcggc cgcctgaact gaaacacaga agac

34

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

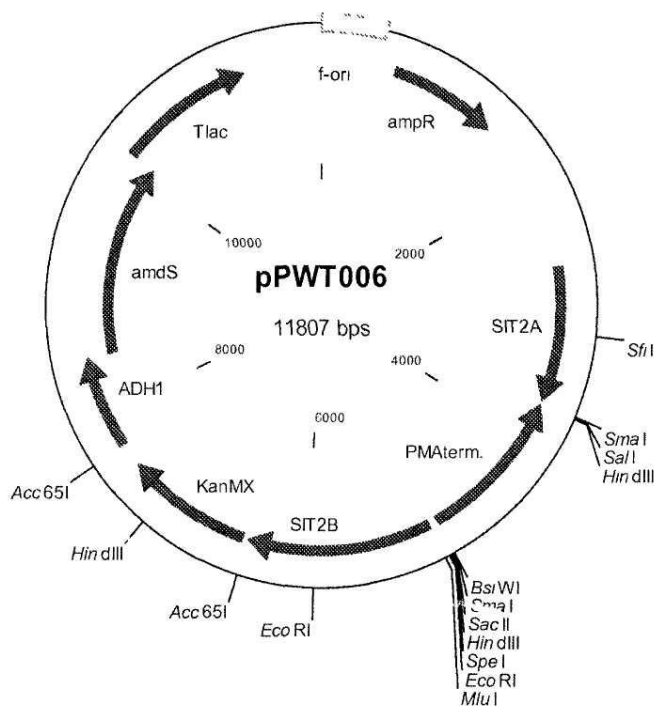
- 5 1. Спосіб отримання одного або більше продуктів ферментації з композиції цукрів, який передбачає наступні стадії:
  - а) ферментацію композиції цукрів у присутності дріжджів, які належать до роду *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* або *Yarrowia*, і
- 10 б) вилучення продукту ферментації, і в якому дріжджі містять гени *araA*, *araB* і *araD*, а композиція цукрів включає глюкозу, галактозу і арабінозу.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що цукри глюкоза, галактоза і арабіноза піддаються конверсії в продукт ферментації.
- 15 3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що одним або більше продуктом(тами) ферментації є етанол.
4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що композиція цукрів отримана з лігноцелюлозного матеріалу шляхом:
  - а) передобробки одного або більше лігноцелюлозних матеріалів для отримання заздалегідь
  - 20 обробленого лігноцелюлозного матеріалу;
  - б) ферментативної обробки заздалегідь обробленого лігноцелюлозного матеріалу для отримання композиції цукрів.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що клітина для ферментації змішаних цукрів є клітиною дріжджів роду *Saccharomyces*.
- 25 6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що клітина для ферментації змішаних цукрів є клітиною дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що клітина для ферментації змішаних цукрів містить делецію гена альдозоредуктази.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що ферментація проводиться за анаеробних умов або за умов обмеженої кількості кисню.
- 30 9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що клітина для ферментації змішаних цукрів містить гіперекспресовані PPP-гени *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* і *RKI1*.
10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що клітина для ферментації змішаних цукрів містить *ху1A*-ген і/або *XKS1*-ген.
- 35 11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що гени були введені в клітину для ферментації змішаних цукрів шляхом введення в клітину-хазяїна:
  - а) кластера, який складається з PPP-генів *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* і *RKI1*, під контролем сильних промоторів,
  - б) кластера, який складається з *ху1A*-гена і *XKS1*-гена, обидва під контролем конститутивних
  - 40 промоторів,
  - с) кластера, що складається з генів *araA*, *araB* і *araD*, і/або кластера з *ху1A*-гена і *XKS1*-гена; і
  - д) делеції гена альдозоредуктази;
- і адаптивної еволюції конструктора для змішаних цукрів для отримання клітини для ферментації змішаних цукрів.
- 45 12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн є стійкою до інгібіторів клітиною.



13. Спосіб за п. 11 або п. 12, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн є промисловим штамом.

14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що продукт ферментації вибраний з групи, яка складається з етанолу, n-бутанолу, ізобутанолу, молочної кислоти, 3-гідроксипропіонової кислоти, акрилової кислоти, оцтової кислоти, бурштинової кислоти, фумарової кислоти, яблучної кислоти, ітаконової кислоти, малеїнової кислоти, лимонної кислоти, адипінової кислоти, амінокислоти, такої як лізин, метіонін, триптофан, треонін і аспарагінова кислота; 1,3-пропандіолу, етилену, гліцерину,  $\beta$ -лактамного антибіотика і цефалоспирину; вітамінів, фармацевтичних засобів, кормових добавок для тварин, хімічних засобів спеціального призначення, хімічної сировини, пластмас, розчинників, палива, включаючи біопаливо і біогаз, або органічних полімерів; і промислового ферменту, такого як протеаза, целюлаза, амілаза, глюканаза, лактаза, ліпаза, ліаза, оксидоредуктаза, трансфераза або ксиланаза.

15. Застосування генів *araA*, *araB* і *araD* для надання шляхом експресії цих генів дріжджам, які зброджують (ферментують) глюкозу і належать до роду *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* або *Yarrowia*, здатності зброджувати (ферментувати) за анаеробних умов галактозу у присутності арабінози після виснаження глюкози.



Фіг. 1

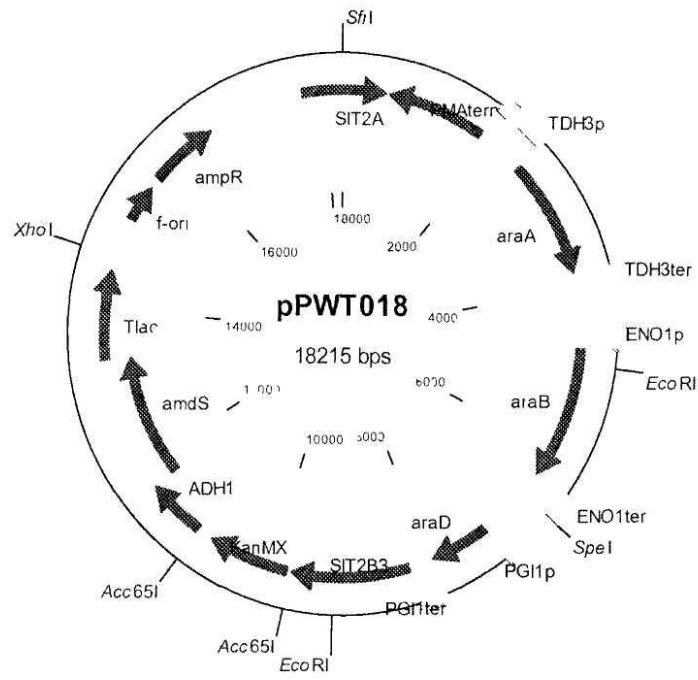


Fig. 2

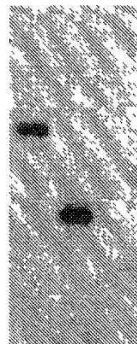
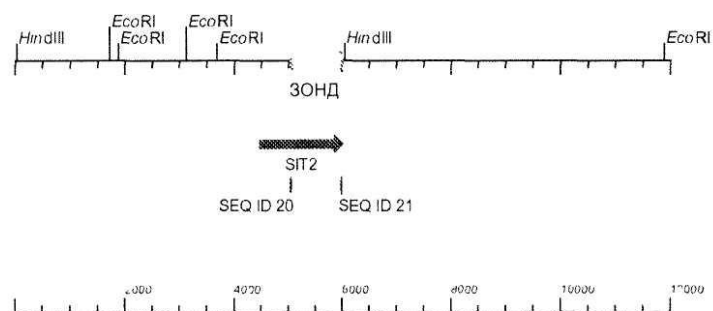
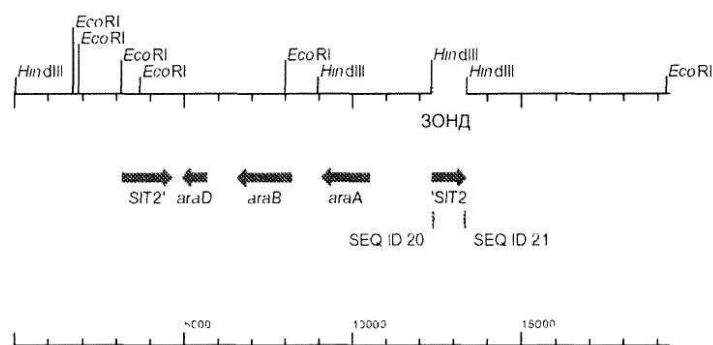


Fig. 3

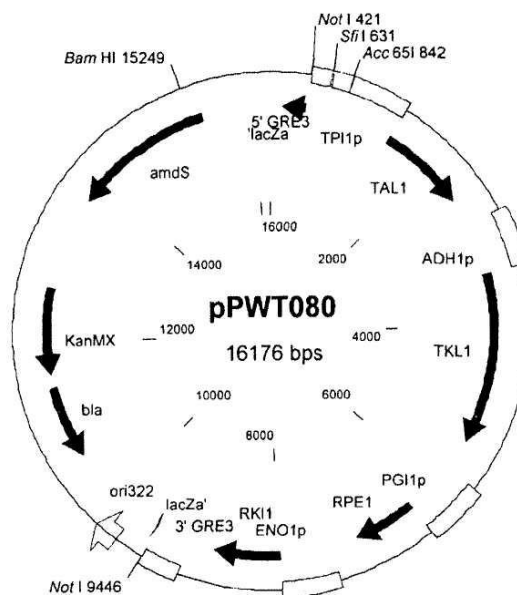


ПАНЕЛЬ А

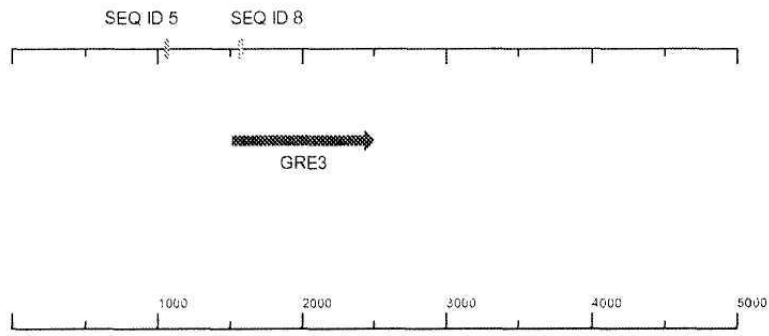


ПАНЕЛЬ В

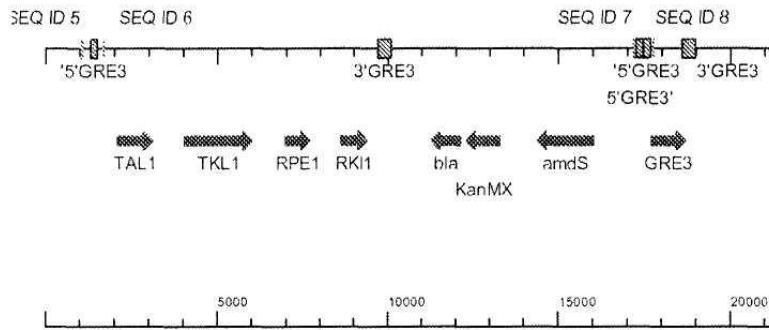
Фиг. 4



Фиг. 5

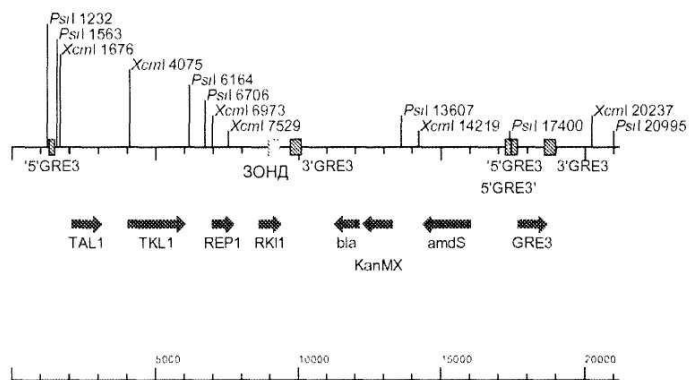


ПАНЕЛЬ А



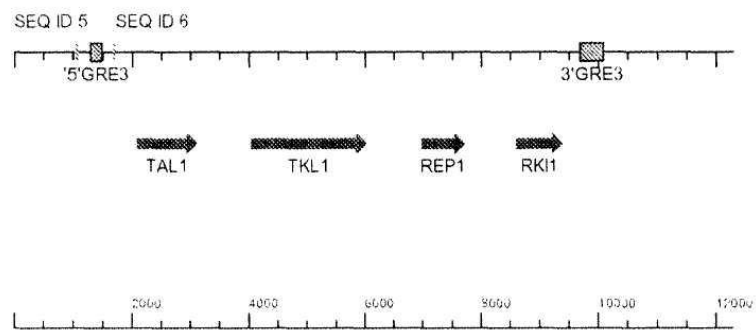
ПАНЕЛЬ В

Фіг. 6

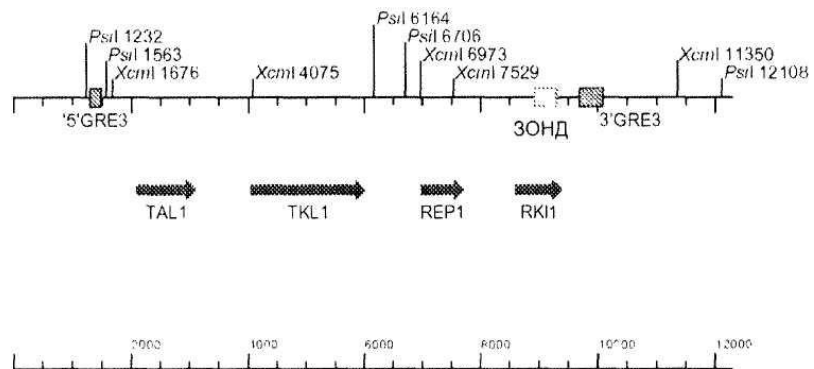


ПАНЕЛЬ С

Фіг. 6 (продовження)

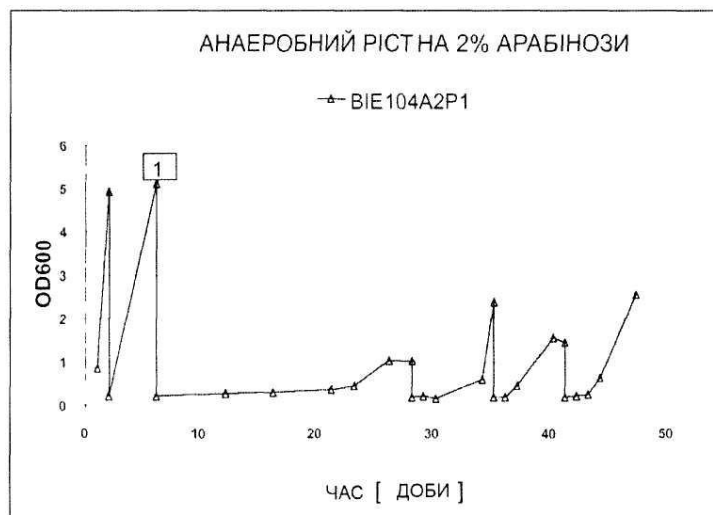


ПАНЕЛЬ А

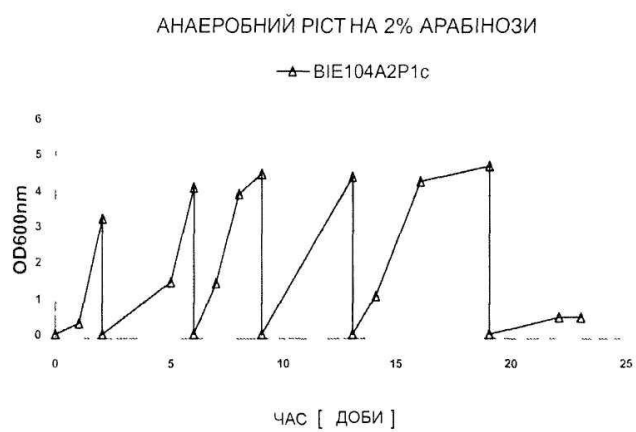


### ПАНЕЛЬ В

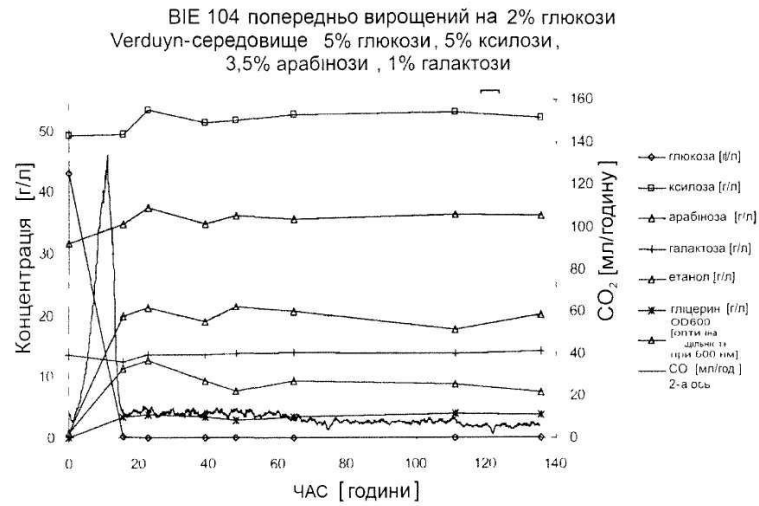
Fig. 7



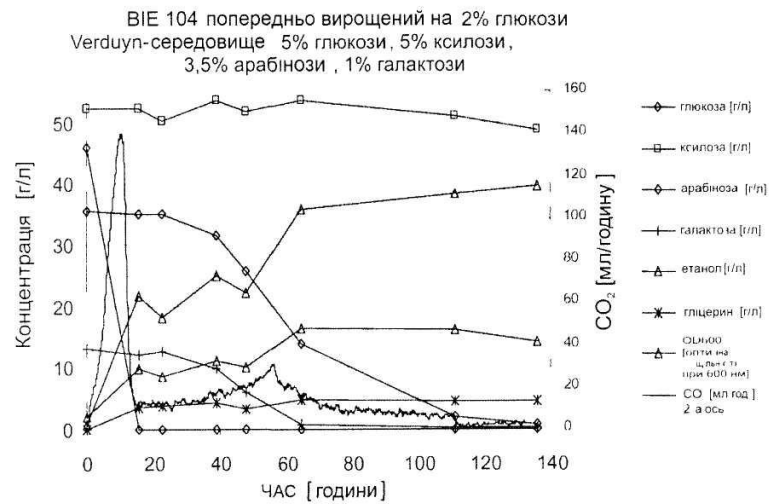
Фіг. 8



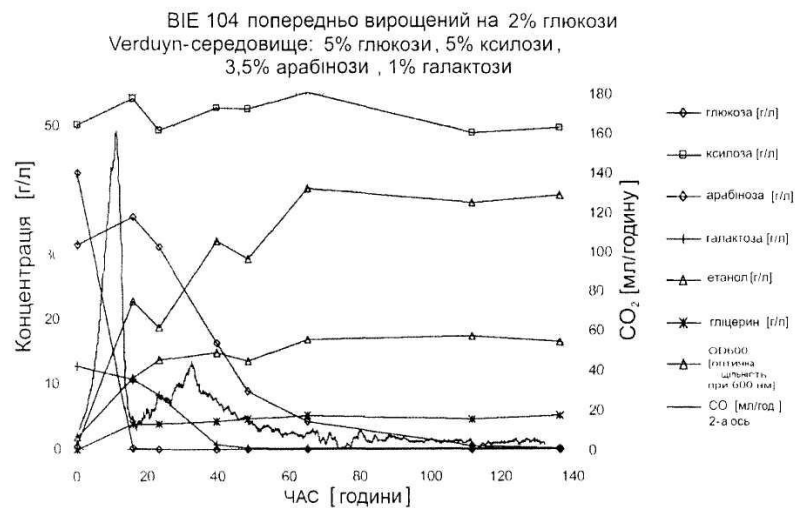
Фіг. 9



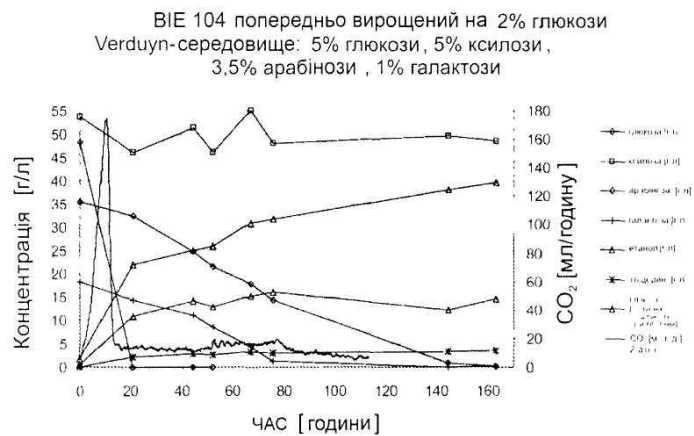
Фіг. 10



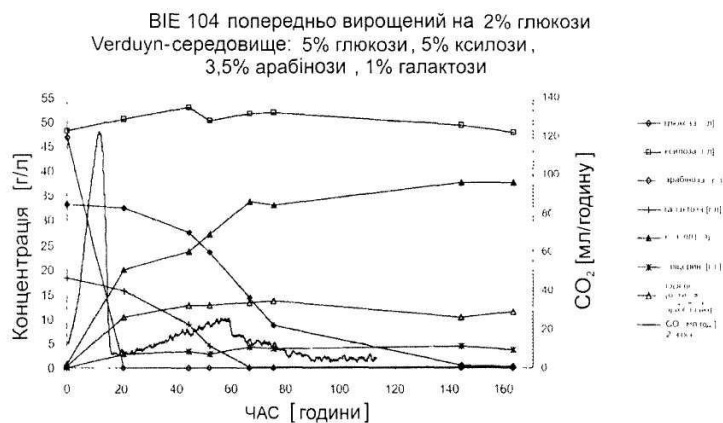
Фіг. 11



Фіг. 12



Фіг. 13



Фіг. 14



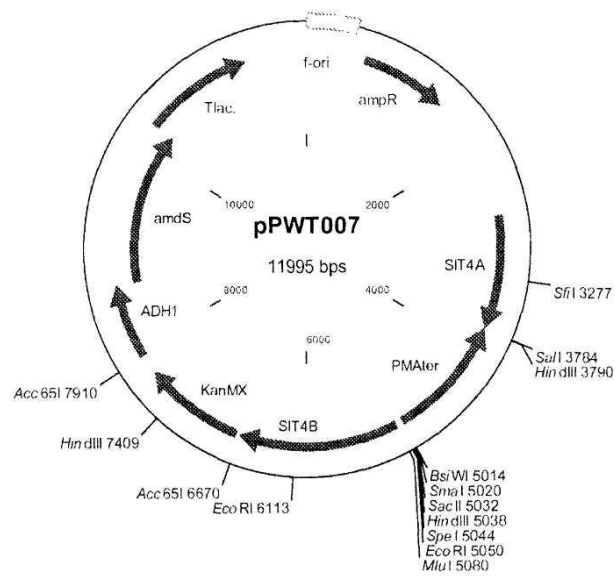


Fig. 15

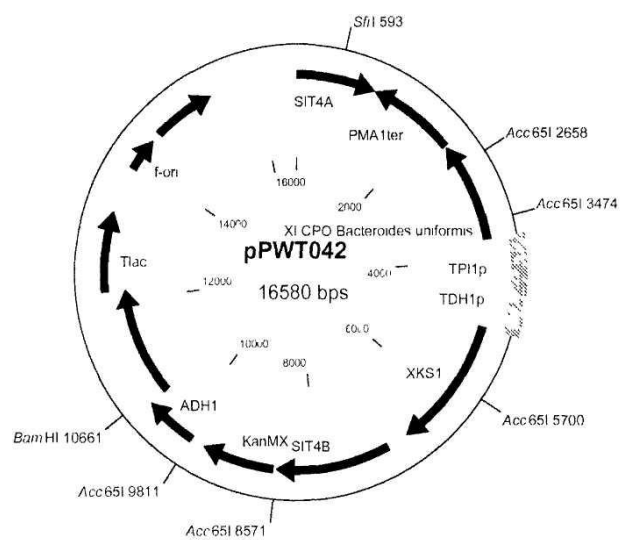
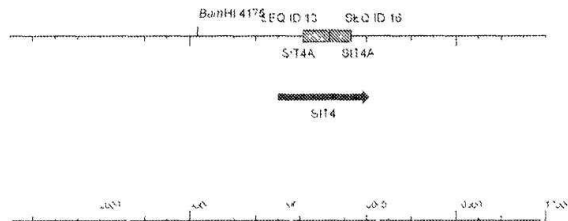
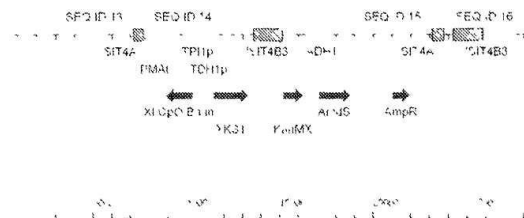


Fig. 16



ПАНЕЛЬ А

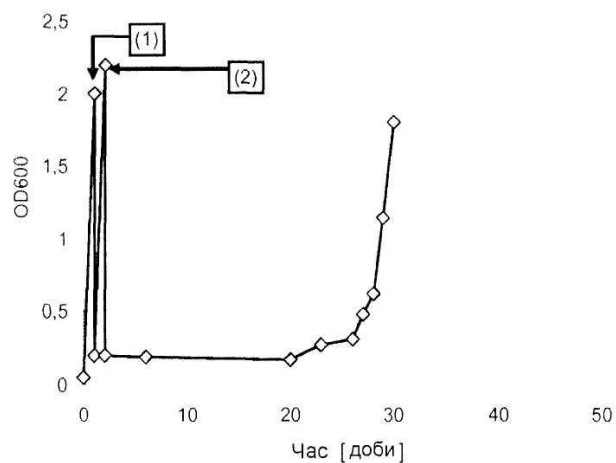


ПАНЕЛЬ В

Fig. 17

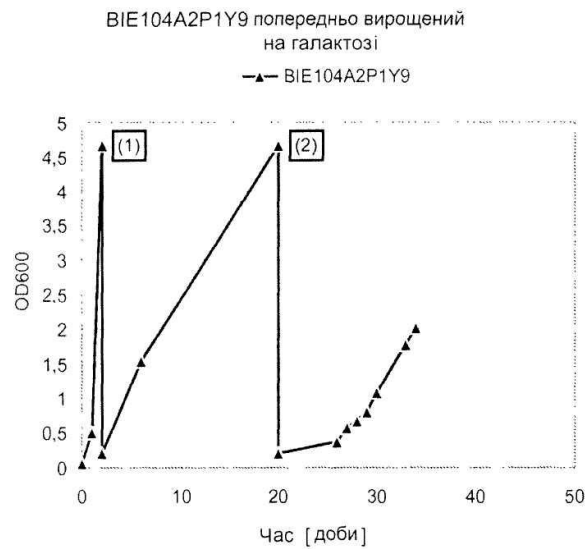
ВІЕ104А2Р1У9 попередньо вирощений  
на глюкозі

—◆— ВІЕ104А2Р1У9



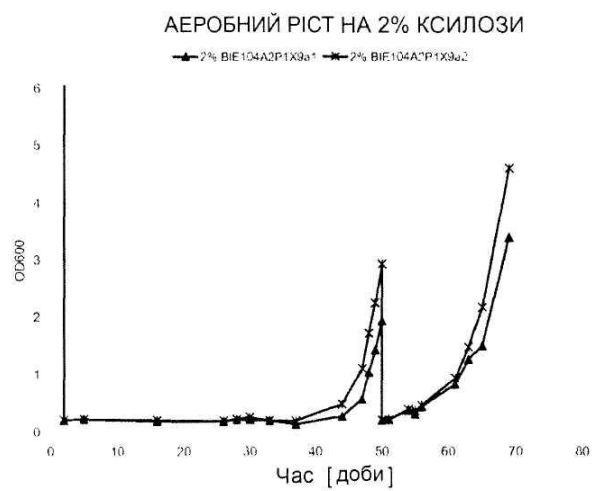
ПАНЕЛЬ А

Fig. 18



ПАНЕЛЬ В

Фіг. 18 (продовження)



Фіг. 19

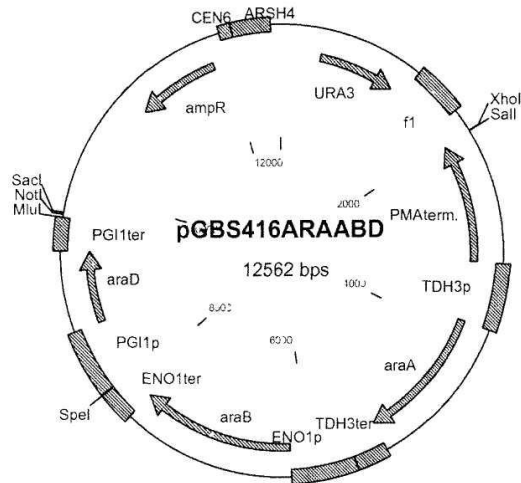


Fig. 20

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601