

## АНОТАЦІЯ

Дзанаєва Л.С. Ідентифікація генів, залучених в регуляцію алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних штамів *Saccharomyces cerevisiae*. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія). - Інститут біології клітини НАН України. - Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2021.

Дисертація присвячена дослідженням у галузі генетичної інженерії дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, спрямованим на підвищення ефективності алкогольної ферментації ксилози.

Інтенсивне використання нафтопродуктів зумовлює коливання цін на цей енергоносіє, та зростання екологічних проблем. Тому одним з основних пріоритетів сьогодення є розробка ефективної технології отримання альтернативних джерел енергії. На ринку біопалив саме етанол отриманий з лігноцелюлозних залишків сільського господарства вважається найбільш перспективним.

На сьогоднішній день біопаливна галузь базується на виробництві етанолу шляхом переробки цукрової тростини, цукрового буряка та злакових (пшениці та кукурудзи). Однак, цей так званий етанол першого покоління, вироблений із крохмалю та цукру, конкурує за джерело отримання із харчовою та кормовою промисловістю. Більш того, вирощування харчових культур відбувається із використанням гербіцидів, посилюючи негативний вплив на довкілля. Використання лігноцелюлозної біомаси для виробництва етанолу другого покоління має стратегічне значення, оскільки це найбільш поширений поновлювальний ресурс на планеті, який не має альтернативного призначення. Крім екологічних переваг етанолу на основі лігноцелюлози її переробка надасть можливість знизити безробіття населення у сільській місцевості.

До складу гідролізатів лігноцелюлози входять два основні цукри: глюкоза, яка зброджується в першу чергу, та ксилоза. Конверсія цієї пентози до етанолу на сьогоднішній день залишається недостатньо ефективною серед мікроорганізмів. До ксилозо-ферментуючих дріжджів належать *Scheffersomyces*

(*Pichia stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Pachysolen tannophilus*, *Ogataea (Hansenula) polymorpha* та ін. Більшість природних штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* не здатні не тільки ферментувати, але й рости на середовищі з ксилозою. Проте пекарські дріжджі ефективно зброджують гексози (вихід етанолу наближається до теоретичного максимуму, що становить 0,51 г/г глюкози), та характеризуються підвищеною стійкістю до екстремальних, промислових умов ферментації, зокрема за осмотолерантністю, стійкістю до високих концентрацій етанолу та низьких значень рН. З метою конструювання ксилозо-ферментуючих дріжджів *S. cerevisiae* було здійснено ряд підходів, проте існуючі рекомбінантні штами потребують додаткового вдосконалення. Ідентифікація нових генів, які можуть бути мішенями у регуляції алкогольної ферментації ксилози з метою подальшої їх інженерії є актуальним завданням.

Нещодавно виявлено, в регуляцію процесу алкогольної ферментації ксилози у *O. polymorpha* залучені пероксисомні ферменти дигідроксиацетонсинтаза та трансальдолаза. Дотепер роль пероксисом у ферментації ксилози у рекомбінантних ксилозо-утилізуючих дріжджів *S. cerevisiae* не вивчалася. Також немає відомостей про участь транскрипційних факторів у регуляції метаболізму ксилози у рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*. У дисертаційній роботі встановлено та охарактеризовано нові механізми регуляції алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*. За допомогою застосованих генно-інженерних методів поліпшено ефективність ферментації цієї пентози. З метою конструювання ксилозо-утилізуючих дріжджів у геном *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D було введено гени, які кодують ферменти початкових етапів катаболізму ксилози: *XYL1*; *XYL2*, що кодують ферменти ксилоредуктазу та ксилітолдегідрогеназу, а також *XYL3*, що кодує ксилулокіназу *S. stipitis*. Ізольований штам GS010, здатний до ферментації ксилози, був використаний у нашій роботі як вихідний.

Для візуалізації пероксисом *S. cerevisiae* GS010 при алкогольній ферментації використано зелений флуоресцентний білок (GFP) із сигнальною послідовністю доставки до пероксисом PTS (peroxisomal targeting signal). За допомогою

флуориметричного та флуоресцентного аналізів показано, що пероксисоми довше зберігалися під час ферментації ксилози ніж на глюкозі. З метою дослідження ролі не окремих пероксисомних ферментів а цілих цих органел здійснено делецію гена *PEX3*, що кодує пероксисомний мембранний білок. Одержаний мутант *rex3Δ* характеризувався вираженим фенотипом, який полягав у повній відсутності пероксисом, та цитоплазматичній локалізації пероксисомних ферментів, де згодом відбувається їх інактивація та деградація. Вперше було показано, що дефіцит пероксисом призводить до зниження накопичення етанолу з ксилози штамом *rex3Δ* в 1,5 раза порівняно з вихідним штамом.

Активні форми кисню, (АФК) зокрема пероксид водню, утворюються та катаболізуються в мітохондріях та пероксисомах. Досліджено рівень АФК в клітинах штаму GS010 під час ферментації глюкози та ксилози, та показано що катаболізм ксилози супряжений з генерацією підвищеної кількості АФК. При ферментації саме ксилози зафіксовано у 1,7-1,8 раза вищий рівень АФК. Збільшення внутрішньоклітинного рівня АФК на ксилозі та зниження продукції етанолу штамом *rex3Δ* привернули нашу увагу до пероксисомних ферментів, які залучені у детоксифікацію пероксиду водню. Вперше встановлено роль пероксисомної каталази *Cta1* в процесі алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантного штаму *S. cerevisiae*. Делеція гена *CTA1* призводила до обмеження приросту біомаси та зниження продукції етанолу в 2 рази у порівнянні з вихідним штамом. За рахунок активності цитозольної ізоформи активність каталази у штамі *cta1Δ* була у 6 разів нижчою порівняно з реципієнтним штамом. У *rex3Δ* мутанта пероксисомна каталаза міслокалізована і не здатна детоксифікувати вільні радикали, зокрема пероксид водню, генерований під час ферментації ксилози.

Встановлено, що посилення експресії гена *PEX34*, що кодує пероксисомний інтегральний мембранний білок, приводить до формування пероксисом більшого розміру та підвищує в 1,4 раза продукцію етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації. Такий вплив може бути пов'язаний з більш

ефективною детоксикацією пероксиду водню, однак інші механізми, що приводять до поліпшення продукції етанолу з ксилози не виключені.

Під час виконання даної роботи на основі ксилозо-ферментуючого штаму *S. cerevisiae* сконструйовано колекцію штамів з делецією та посиленою експресією низки генів *ADRI*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1* та *ZNF1*, що кодують транскрипційні фактори та досліджено їх вплив на алкогольну ферментацію ксилози. Транскрипційний фактор Znf1 *S. cerevisiae* належить до родини транскрипційних активаторів цинкового кластеру та зв'язується з промоторами генів, продукти яких беруть участь у клітинному диханні, глюконеогенезі, циклі трикарбонових кислот та гліюксилатному шунті. Встановлено, що Znf1 не впливає на алкогольну ферментацію ксилози у *S. cerevisiae*, оскільки, як делеція так і посилення експресії *ZNF1* не змінювали рівень продукції етанолу при ферментації цієї пентози. Кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі деяких генів, що кодують ферменти циклу трикарбонових кислот, глюконеогенезу, пентозофосфатного шляху в умовах ферментації ксилози теж не виявив значних відмінностей в експресії.

Транскрипційний фактор цинкового кластеру Sip4, який є субстратом протеїнкінази Snf1, взаємодіє з CSREs (cell type-specific regulatory elements) елементами і є активатором генів, що кодують ферменти глюконеогенезу. Для з'ясування потенційної регуляторної ролі *SIP4* у метаболізмі ксилози було сконструйовано штами з делецією та посиленою експресією цього гена. Продукція етанолу надекспресуючим штамом *SIP4* була знижена більш ніж вдвічі, порівняно з батьківським, і становила 2,8 г/л. За результатами кількісного ПЛР-аналізу у реальному часі встановлено, що посилення експресії гена *SIP4*, на противагу до *sip4Δ*, значно (у 3,23 рази) підвищило експресію гена *FBP1* (кодує фруктозо-1,6-бісфосфатазу), що опосередковано вказує на підвищення активності глюконеогенезу. Тому імовірно, що інтермедіати гліколізу - фруктозо-6-фосфат та гліцеральдегід 3-фосфат, утворені у реакціях неокисної ланки ПФШ, перетворюються до глюкози. Отримані результати узгоджуються із зниженням продукції етанолу при алкогольній ферментації ксилози у штамів *sip4Δ* та *SIP4*.

Adr1, так само як і Cat8, - це транскрипційні регулятори, які залежать від Snf1-опосередкованої індукції та здійснюють дерепресію низки генів, залучених у глюконеогенез та  $\beta$ -окислення. Adr1 є позитивним регулятором транскрипції генів, що кодують пероксисомні білки. Встановлено, що як делеція так і посилена експресія *ADR1* призводили до зниження продукції етанолу з ксилози, що становила 4,3 г/л для *adr1 $\Delta$*  та 4,25 г/л для *ADR1*, тоді як вихідний штам GS010 продукував 5,85 г/л етанолу. Не виявлено суттєвих відмінностей у експресії більшості аналізованих генів: *ICL1*, *ACO1*, *CIT1*, *FUM1*, *MDH1*, *ADH1*, *PDC1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKII* та *RPE1* у штаму *adr1 $\Delta$*  під час ферментації ксилози.

*S. cerevisiae* Cat8 - це активатор транскрипції цинкового кластера, який регулює експресію генів, що беруть участь в глюконеогенезі, утилізації етанолу, та диауксичному переході від ферментації до дихання. Одержаний мутант *cat8 $\Delta$*  демонстрував підвищення продукції етанолу з ксилози на 9,5% порівняно із батьківським штамом. Посилення експресії *CAT8* навпроти, призвело до зниження продукції етанолу на 7,3% порівняно з вихідним штамом GS010.

Транскрипційний фактор *Asg1* теж належить до родини цинкового кластеру та є регулятором генів кількох метаболічних шляхів:  $\beta$ -окислення, гліюксилатного циклу, глюконеогенезу, та імпорту довго-ланцюгових жирних кислот до пероксисом. Делеція *ASG1* у штамі GS010 призвела до зниження продукції етанолу з ксилози у 1,23 раза.

*Tup1* - загальний репресор транскрипції, утворює комплекс з *Sus8*, бере участь у створенні репресивної структури хроматину через взаємодію з гістонами H3 та H4. Делеція *TUP1* у штамі GS010 спричинила зниження накопичення біомаси в 4 раза у рідкому середовищі з ксилозою в аеробних умовах, а при ферментації цієї пентози продукція етанолу була нижчою в 1,58 раза. Продукція етанолу з глюкози була нижчою в 1,26 раза.

У *S. cerevisiae* ідентифіковано транскрипційний активатор *Hap4*, що відіграє ключову роль у контролі експресії генів мітохондріального дихання. Встановлено, що ген *HAP4* залучений в регуляцію алкогольної ферментації

ксилози у штаму GS010. Виявлено, що делеція *HAP4* суттєво поліпшує продукцію етанолу при ферментації ксилози. Мутант продукує 10,4 г/л етанолу, при цьому вихід етанолу сягає 0,414 г/г ксилози. Натомість посилення експресії *HAP4* призводило до зниження продукції етанолу при ферментації ксилози. У надекспресуючому штамі *HAP4* виявлено зростання експресії гена *FBP1* більше ніж в 2 рази. Делеція *HAP4* призводила до зниження рівня експресії генів ЦТК: *FUM1* (у 5 разів), *MDH1* (у 2,5 раза), *CIT1* (у 2,2 раза), та одного із генів гліюксилатного циклу *ICL1* (у 3,8 раза).

У результаті роботи ідентифіковано нові мішені для створення продуцентів паливного етанолу на основі ксилозо-ферментуючих штамів дріжджів *S. cerevisiae*. Вперше показано залучення пероксисом у регуляцію процесу ферментації ксилози *S. cerevisiae*. Виявлено, що делеція гена *HAP4* суттєво поліпшує продукцію етанолу при ферментації ксилози. Застосовані у роботі генно-інженерні підходи можуть бути екстрапольовані на інші перспективні дріжджові продуценти паливного етанолу. Сконструйовані штами можуть слугувати основою для подальших генно-інженерних маніпуляцій.

**Ключові слова:** етанол, ксилоза, лігноцелюлоза, метаболічна інженерія, дріжджі, *Saccharomyces cerevisiae*, пероксисоми, ідентифікація генів, транскрипційні фактори.

## SUMMARY

*Dzanaeva L. S.* Identification of genes involved in the regulation of alcoholic fermentation of xylose in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for PhD degree in Biology (specialty 091 "biology"). - Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2021.

The thesis is devoted to the research in the field of genetic engineering of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, aimed at increasing the efficiency of xylose alcoholic fermentation.

Intensive use of petroleum products causes fluctuations in prices for this energy source and the growth of environmental problems. Therefore, one of the main

priorities today is to develop efficient technology for alternative energy sources. In the biofuel market, ethanol derived from lignocellulosic agricultural residues considered to be the most promising.

Today, the biofuel industry is based on ethanol production by processing sugar cane and cereals (wheat and corn). However, this so-called first-generation ethanol, made from starch and sugar, competes with the food and feed industries. Moreover, food crops are grown using herbicides, increasing the negative impact on the environment. The use of lignocellulosic biomass for second-generation ethanol production has strategic importance because it is the most common renewable resource on the planet, which has no alternative use. Besides the environmental benefits of lignocellulose-based ethanol, its processing will provide an opportunity to reduce unemployment in rural areas.

The composition of lignocellulose hydrolysates includes two main sugars: glucose, which ferments first, and xylose. The conversion of this pentose to ethanol today remains ineffective among microorganisms. Xylose-fermenting yeasts involve *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Pachysolen tannophilus*, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, and other. Natural *Saccharomyces cerevisiae* strains are not only able to ferment but also to grow on a medium with xylose. However, baker's yeast effectively ferments hexoses (ethanol yield approaches the theoretical maximum of 0,51 g/g) and is characterized by increased resistance to extreme, industrial fermentation conditions, including osmotolerance, resistance to high concentrations of ethanol and low pH values. A number of approaches have been taken to construct xylose-fermentable yeast *S. cerevisiae*, but existing recombinant strains need further improvement. Identification of new genes that may be targets in the regulation of alcoholic fermentation of xylose for further engineering is an urgent task.

To date, the role of peroxisomes in xylose fermentation in recombinant xylose-fermenting *S. cerevisiae* yeast has not been studied. There is also no information on the influence of transcription factors in the xylose metabolism regulation in recombinant xylose-utilizing *S. cerevisiae* strains. In the dissertation work new mechanisms of regulation of alcoholic fermentation of xylose in recombinant strains

*S. cerevisiae* are presented. The efficiency of fermentation of this pentose in yeast producers of ethanol has been improved by means of applied genetic engineering methods. In order to design xylose-utilizing yeast in the genome of *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D were introduced genes encoding enzymes of the initial stages of xylose conversion: *XYL1*; *XYL2*, which encode xylose reductase and xylitol dehydrogenase, and *XYL3*, which encodes xylulokinase of *S. stipitis*. The GS010 strain was used in our work as a source.

Green fluorescent protein (GFP) with PTS (peroxisomal targeting signals) peroxisome delivery sequence was used to visualize *S. cerevisiae* GS010 peroxisomes during alcoholic fermentation. Fluorimetric and fluorescence analyzes showed that peroxisomes persisted longer during xylose fermentation than on glucose. To study the role not just individual peroxisomal enzymes but whole organelles, deletion of the *PEX3* gene encoding a peroxisomal membrane protein was performed. The resulting *pex3Δ* mutant was characterized by a pronounced phenotype, which consisted of a complete absence of peroxisomes, and cytoplasmic localization of peroxisomal enzymes, where their subsequent inactivation and degradation occur. For the first time it was shown that peroxisome deficiency leads to a decrease in the accumulation of ethanol from xylose in strain *pex3Δ* for 1,5-times as compared to the original strain.

ROS, including hydrogen peroxide, are formed and catabolized in mitochondria and peroxisomes. The ROS level in GS010 strain cells during glucose and xylose fermentation was studied, and it was shown that xylose is more actively involved in the generation of ROS. Namely, 1,7-1,8 times higher ROS levels were recorded during the fermentation of xylose. The intracellular increase in ROS levels on xylose and its decrease during ethanol production by the *pex3Δ* strain has drawn our attention to peroxisomal enzymes that are involved in the detoxification of hydrogen peroxide. For the first time, the role of peroxisomal catalase in the process of alcoholic fermentation of xylose in a recombinant strain of *S. cerevisiae* was revealed. The *CTAI* gene deletion led to a limitation of biomass growth and a 2-fold decrease in ethanol production compared to the original strain. The catalase activity in the *ctal1Δ* strain was 6 times lower compared to the recipient strain. In the *pex3Δ*



mutant, Cta1 is incorrectly localized and unable to detoxify free radicals, in particular hydrogen peroxide generated during xylose fermentation.

It was found that the overexpression of the *PEX34* gene, encoding a peroxisomal integral membrane protein, leads to the formation of larger peroxisomes and increases by 1,4-times the ethanol accumulation level from xylose under alcoholic fermentation conditions. This effect may be associated with more effective detoxification of hydrogen peroxide, but other mechanisms that lead to improved ethanol production from xylose are not excluded.

During this work, a collection of strains with deletion and enhanced expression of *ADR1*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1*, and *ZNF1* genes encoding transcription factors was constructed based on the xylose-fermenting strain of *S. cerevisiae* and the mechanisms of regulation of alcoholic fermentation of xylose in the constructed strains were investigated. The transcription factor Znf1 *S. cerevisiae* belongs to the family of transcriptional activators of the zinc cluster and binds to the promoters of the genes whose products are involved in cellular respiration, gluconeogenesis, the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. It was found that Znf1 does not affect the alcoholic fermentation of xylose in *S. cerevisiae*, since both *ZNF1* deletion and overexpression did not alter ethanol production during fermentation of this pentose. Real-time quantitative PCR analysis of some genes encoding tricarboxylic acid cycle enzymes, gluconeogenesis, PPP under conditions of xylose fermentation also did not reveal significant differences in the expression of target genes.

The transcription factor of the zinc cluster Sip4 is a substrate of the protein kinase Snf1, and interacts with CSREs elements and is an activator of genes encoding enzymes of gluconeogenesis. To clarify the regulatory role of *SIP4* in xylose metabolism, strains with deletion and enhanced expression of this gene were constructed. The production of ethanol by strain *SIP4* was reduced more than twice compared to the parent strain and reached 2,8 g/l. According to the results of quantitative real-time PCR analysis, it was found that overexpression of the *SIP4* gene, in contrast to *sip4Δ*, significantly increased the expression of *FBP1* (3,23-fold), indicating increase in gluconeogenic activity. Therefore, it is probable that the intermediates of glycolysis - fructose-6-phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate,

formed in the reactions of the non-oxidative unit of PPP, are predominantly converted to glucose. The obtained results are in good agreement with the decrease in ethanol production during alcoholic fermentation of xylose.

Adr1 is a positive regulator of transcription of the genes encoding peroxisomal proteins. Adr1 and Cat8 are transcriptional regulators that depend on Snf1-mediated induction and derepress a number of genes involved in gluconeogenesis and  $\beta$ -oxidation. We found that both deletion and overexpression of *ADR1* led to a decrease in ethanol production from xylose, which was 4,3 g/l for *adr1 $\Delta$*  and 4,25 g/l for *ADR1*, whereas strain GS010 showed 5,85 g/l of ethanol. No significant differences were found in the expression of most of the analyzed genes in *adr1 $\Delta$*  during xylose fermentation relative to its parental strain.

*S. cerevisiae* Cat8 is a Zn-cluster transcriptional activator necessary for expression of the genes involved in gluconeogenesis, ethanol utilization and diauxic shift from fermentation to respiration. The obtained *cat8 $\Delta$*  mutant showed an increase in ethanol production from xylose by 9,5% compared to the parental strain GS010. Overexpression of *CAT8*, in contrast, led to a decrease in ethanol production by 7,3%.

The transcription factor Asg1 also belongs to the Zn-cluster family and is a regulator of the genes of several metabolic pathways:  $\beta$ -oxidation, glyoxylate cycle, gluconeogenesis, and import of long-chain fatty acids to peroxisomes. Deletion of *ASG1* led to a decrease in ethanol production from xylose by 1,23-times.

Transcriptional repressor Tup1 forming a complex with Cyc8p, is involved in the creation of the repressive structure of chromatin through interaction with histones H3 and H4. Deletion of *TUP1* caused a 4-fold decrease in biomass accumulation in liquid medium with xylose under aerobic conditions, and ethanol production was 1,58-times lower during the fermentation of this pentose. Ethanol production from glucose was 1,26-times lower.

In *S. cerevisiae* transcriptional activator Hap4 was identified, which plays a key role in controlling mitochondrial respiration gene expression. The involvement of the *HAP4* gene in the regulation of alcoholic fermentation of xylose has been established. Deletion of *HAP4* was found to significantly improve ethanol production during xylose fermentation. The mutant produces 10,4 g/l of ethanol, while the yield of

ethanol reaches 0,414 g/g. Instead, increased expression of *HAP4* led to the opposite effect, namely a decrease in ethanol production during xylose fermentation. In the *HAP4* strain we revealed an increase in *FBP1* gene expression by more than 2-times. Deletion of *HAP4* led to a decrease in the expression of TCA (tricarboxylic acid cycle) genes: *FUM1* (5-times), *MDH1* (2,5-times), *CIT1* (2,2-times), and one of the genes of the glyoxylate cycle *ICL1* (3,8-times).

As a result, new targets were identified to construct fuel ethanol producers based on xylose-fermenting *S. cerevisiae* yeast strains. The involvement of peroxisomes in the xylose fermentation process of *S. cerevisiae* has been shown for the first time. Deletion of the *HAP4* gene was found to significantly improve ethanol production during xylose fermentation. The genetically engineered approaches used in the work can be extrapolated to other promising yeast producers of fuel ethanol. The engineered strains can serve as a basis for further genetic engineering manipulations.

**Key words:** ethanol, xylose, lignocellulose, metabolic engineering, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, peroxisomes, gene identification, transcription factors.

#### Список публікацій здобувача:

За темою дисертації опубліковано 9 наукових робіт, серед яких 3 статті у рецензованих журналах, та 6 тез доповідей на конференціях, з'їздах та симпозиумах, на яких були апробовані результати дисертації.

1. Dzanaeva L, Kruk B, Ruchala J, Nielsen J, Sibirny A, Dmytruk K. The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*. (2020). *Cell Biology International*. [doi:10.1002/cbin.11353](https://doi.org/10.1002/cbin.11353)
2. Dzanaeva L, Ruchala J, Sibirny A, Dmytruk K. The impact of transcriptional factors *Znf1* and *Sip4* on xylose alcoholic fermentation in recombinant strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (2020). *Cytology and Genetics*. Vol.54, No.5, pp. 386-392. [doi:10.3103/S0095452720050035](https://doi.org/10.3103/S0095452720050035)
3. Dzanaieva L. S., Dmytruk K. V., Sibirny A. A. Transcriptional factor *Cat8* is involved in regulation of xylose fermentation in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. (2018). Т. 22. С. 329-334. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.970>

4. Dzanaieva L.S, Kurylenko O.O, Dmytruk K.V, Sibirny A.A Construction of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strains capable of converting xylose into ethanol, 7th International Weigl Conference, September 26-29, Lviv, Ukraine, Book of Abstracts. – 2017.
5. Dzanaieva L, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strains able to xylose utilization, Conference of young scientists of Institute of Cell biology; Lviv, Ukraine, May 25<sup>nd</sup> 2017.
6. Dzanaieva L, Dmytruk K, Sibirny A. “Effect of deletion of transcription factors on xylose fermentation performants of engineered *Saccharomyces cerevisiae*,” Conference of young scientists of Institute of Cell biology, Lviv, Ukraine, May 31<sup>nd</sup> 2018.
7. Dzanaieva L, Dmytruk K, Sibirny A. “Effect of deletion of transcription factors on xylose fermentation performants of engineered *Saccharomyces cerevisiae*,” Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. 2018. P 74.
8. Dzanaieva L, Dmytruk K, Sibirny A. The role of transcription factors in xylose fermentation of engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae* // 6<sup>th</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. June 18-21, 2019, Yaremche, Ukraine.
9. Dzanaieva L, Dmytruk K, Sibirny A. The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*, Conference of young scientists of Institute of Cell Biology. – Lviv, Ukraine, May 2019.