

Тайпакова С.М.,
Смекенов И.Т., Бисенбаев А.К.

Научно-исследовательский институт
проблем биологии и биотехнологии,
Казахский национальный университет
имени аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы

Создание рекомбинантных штаммов дрожжей для получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья

Taipakova S.M.,
Smekenov I.T., Bissenbaev A.K.

Institute of Biology and Biotechnology
Problems, al-Farabi Kazakh National
University, Kazakhstan, Almaty

Development of recombinant yeast strains for production of bioethanol from cellulosic feedstock

Тайпақова С.М.,
Смекенов И.Т., Бисенбаев А.Қ.

Биология және биотехнология
мәселелері ғылыми-зерттеу
институты, әл-Фараби атындағы
Қазақ ұлттық университеті,
Қазақстан, Алматы қ.

Целлюлозалы шикізаттан биоэтанол өндіру мақсатында ашытқылардың рекомбинантты штамдарын алу

С помощью генно-инженерных методов сконструирован рНО-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-myc-6xHis-GAPDH- α -bgII-flag-KanMX4-НО, содержащий гены эндо-1,4- β -глюканазы, целлюбиогидролазы и β -гликозидазы. Каждый ген в составе интегрального вектора содержал сигнальный пептид α -фактора дрожжей и экспрессировался под контролем промотора глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы.

Созданы новые стабильные штаммы дрожжей с генами целлюлитических ферментов в НО локусе хромосомы дрожжей. Хромосомная интеграция генов эндо-1,4- β -глюканазы, целлюбиогидролазы и β -гликозидазы в НО locus генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР. Данный штамм обеспечивает непрерывную экспрессию генов целлюлитических ферментов и секрецию продуктов экспрессии в окружающую среду. Показано, что рекомбинантные штаммы *S.cerevisiae*, экспрессирующие гены целлюлаз, способны расти в синтетической среде, содержащей целлюбиозу или карбоксиметилцеллюлозу (СМС) в качестве единственного источника углерода. Кроме того, рекомбинантный штамм производит 15,6 г/л этанола из 20% целлюбиозы и 20% СМС. Эти результаты свидетельствуют о том, что рекомбинантные штаммы *S.cerevisiae* могут быть применимы к одновременному осахариванию и ферментации целлюлозосодержащей биомассы.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, целлюбиогидролаза, β -гликозидаза, эндо-1,4- β -глюканаза, сигнальный пептид α -фактора дрожжей, геномная интеграция.

By means of gene engineering approaches the рНО-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-myc-6xHis-GAPDH- α -bgII-flag-KanMX4-НО integral cassette, including endo- β -1, 4-glucanase, exo-1, 4- β -glucanase (cellobiohydrolase), exo-1, 4- β -glucosidase genes was constructed. Each gene included in integral vector are comprises the signal peptide of yeast α -factor and expressed under the control of a promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The constructed vector provides targeted integration of cellulose genes at *S. cerevisiae* HO locus. Integral vector contain KanMX selectable marker, and integrants can be selected by resistance to G418.

New stable yeast strains carrying cellulose genes in yeast genome were developed. Chromosomal integration of cellulase genes into HO locus of yeast genome was confirmed by PCR. The strain shows continuous expression of cellulase genes and secretion of the protein products into surrounding medium. It has been shown that recombinant *S. cerevisiae* expressing cellulase genes became able to grow in synthetic medium containing cellobiose or carboxymethyl-cellulose as the single carbon source. Moreover, the recombinant strain produced 15,6 g/L ethanol from 20% cellobiose and 20% СМС. These results suggest that recombinant *S. cerevisiae* strains may be applicable to the simultaneous saccharification and fermentation cellulose biomass.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, cellobiohydrolase, β -glycosidase, endo-1,4- β -glucanase, signal peptide of yeast α -factor, genomic integration.

Гендік инженерия әдістерін қолдана отырып, құрамында эндо-1,4- β -глюканаза, целлюбиогидролаза және β -гликозидаза гендері бар рНО-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-myc-6xHis-GAPDH- α -bgII-flag-KanMX4-НО құрастырылды. Интегральды вектордың құрамындағы әрбір генде ашытқы α -факторының сигналды пептиді болады, әрі глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа промоторы бақылауында экспрессияланады.

Ашытқылар хромосомасының НО локусындағы целлюлитикалық ферменттердің гендері бар ашытқылардың жаңа тұрақты штамдары жасалды. Эндо-1,4- β -глюканаза, целлюбиогидролаза және β -гликозидаза гендерінің ашытқылар геномының НО локусына хромосомалық интеграциясы ПТР әдісі арқылы дәлелденген. Бұл штамм целлюлитикалық ферменттер гендерінің үздіксіз экспрессиясын және қоршаған ортаға экспрессия өнімдерінің секрециялануын қамтамасыз етеді. Целлюлоза гендерін экспрессиялай алатын *S.cerevisiae* рекомбинантты штамдары құрамында көмірсудың жалғыз көзі ретінде целлюбиоза немесе карбоксиметилцеллюлозасы (СМС) бар синтетикалық ортада өсуге қабілетті екендігі көрсетілген. Бұдан басқа, рекомбинантты штамм 20% целлюбиозадан және 20% СМС-тан 15,6 г/л этанол өндіреді.

Түйін сөздер: *Saccharomyces cerevisiae*, целлюбиогидролаза, β -гликозидаза, эндо-1,4- β -глюканаза, ашытқы α -факторының сигналды пептиді, геномдық интеграция.

**СОЗДАНИЕ
РЕКОМБИНАНТНЫХ
ШТАММОВ
ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ
БИОЭТАНОЛА
ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗО-
СОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ**

Введение

Целлюлоза является наиболее распространенным биологическим полимером. Она представляет собой линейный полимер, *D-гликопиранозные* остатки которого связаны β -1,4-гликозидными связями. В зависимости от растительного источника степень полимеризации нативной целлюлозы может составлять приблизительно от 10 тыс. (у древесины) до 15 тыс. (у хлопка) [1]. Эффективная деструкция целлюлозы до растворимых сахаров, обычно требует совместное действие трех типов ферментов: эндо-1,4- β -глюканазы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4- β -глюканазы (КФ 3.2.1.91) и 1,4- β -гликозидазы (КФ 3.2.1.21) [2]. Эндо-1,4- β -глюканазы гидролизуют внутренние β -1,4-гликозидные связи, экзо-1,4- β -гликозидазы (целлобиогидролазы) отщепляют целлобиозу с конца полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы и в свою очередь β -гликозидазы расщепляют целлобиозу до глюкозы [3-5]. Эти ферменты известны как целлюлазы, которые проявляют синергизм для полного гидролиза целлюлозы до растворимых олигомерных и мономерных сахаров.

В настоящее время целлюлитические ферменты используются в качестве добавок к детергентам и моющим средствам, целлюлозно-бумажной промышленности, в составе премиксов к кормам животных и птиц, и даже в пищевой промышленности [6]. В последнее время в связи с истощением запасов нефти и газа в энергетике широко обсуждаются проблемы применения технологии консолидированного биопроцесса гидролиза и сбраживания (СВР), т.е. прямой ферментации целлюлозосодержащего субстрата в этанол [7].

Из-за высокой способности сбраживать глюкозу до этанола и выдерживать высокое содержание этанола в среде, грибные целлюлазные гены были клонированы и экспрессированы в штаммах *S.cerevisiae* [8]. Кроме этого созданный рекомбинантный штамм *S.cerevisiae* коэкспрессирующий три целлюлитических фермента (экзо-1,4- β -глюканазы, эндо-1,4- β -глюканазы и 1,4- β -гликозидазы) способен конвертировать аморфную целлюлозу в этанол [9]. Однако во всех вышеперечисленных работах в качестве экспрессирующего вектора использовались эписомные, или плазмидные вектора.

С практической точки зрения для стабильности белка, а также для предотвращения потери рекомбинантного гена в отсутствие селективного фактора, более подходящим являются использование интегральных векторов - обеспечивающих внедрение генов в хромосому дрожжей [10]. В связи с этим δ -интеграционные векторы были использованы для стабильного повышения числа копий гена-мишени в *S.cerevisiae*. Длинные концевые повторы Ту-элемента, известные как δ -последовательность, являются хорошими мишенями для интеграции генов путем гомологичной рекомбинации, так как по всему геному дрожжей содержится приблизительно 425 копий данной последовательности [11]. Векторы для δ -интеграции были использованы для экспрессии человеческого фактора роста [12], антикоагулянта-гирудин [13], глюкоамилазы [14]. Относительно недавно были сконструированы рекомбинантные штаммы *S.cerevisiae*, содержащие множество копий генов эндоглюканазы, целлобиогидролазы и β -гликозидазы, интегрированные в хромосому посредством интегрального вектора на основе δ -последовательности [11,15]. Данный подход значительно увеличил целлюлолитическую активность рекомбинантного штамма. Однако все вышеперечисленные интеграционные векторы, содержат ауксотрофные маркерные гены, такие как *LEU2-D*, *HIS3*, *TRP1* и *URA3*. Описанные подходы вынуждают работать с узким кругом хорошо охарактеризованных мутантных штаммов дрожжей. Такие штаммы дрожжей не пригодны для промышленного использования, поскольку в случае промышленных дрожжей не существует внутренних генетических маркеров, таких как потребность в аминокислотах или нуклеиновых кислотах и т.д.

Ворт с соавторами [16] сообщили о создании нескольких интегральных дрожжевых векторов способных включаться в хромосому дрожжей путем генного замещения с использованием участка гомологичной последовательности *HO* гена. *HO* ген кодирует эндонуклеазу, ответственную за превращение дрожжевой клетки в клетку

противоположного типа спаривания и инициирует диплоидизацию гаплоидных клеток [17]. Показано что, делеция, *HO* локуса не влияет на рост дрожжей и практически все лабораторные и промышленные штаммы *S. cerevisiae* имеют мутации в данном локусе.

В настоящей работе с использованием вектора для геномной интеграции получены новые штаммы дрожжей эффективно экспрессирующие эндо-1,4- β -глюканазу, β -гликозидазу гриба рода *Aspergillus* и целлобиогидролазу гриба *Lentinula edodes*. Хромосомная интеграция генов *eng1*, *cel7A* и *bglI* гриба *L.edodes* в *HO* локус генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР. Показана способность рекомбинантных штаммов расти в среде с целлобиозой и карбоксиметилцеллюлозой в качестве единственного источника углеводов.

Материалы и методы

В ходе работы использовали клеточные линии: DH5 α (F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Ф80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -) для наработки плазмидной ДНК и дрожжевой экспрессионный штамм FF18733 (MATa his7-2 leu2-3,112 lys1-1 trp1-289 ura3-52) фирмы «Stratagene» (США). Культивирование бактерий *E.coli* проводили при 37 °С в полноценной среде LB при необходимости дополненной ампициллином в конечной концентрации 100 мкг/мл. Дрожжи выращивали при 30 °С в среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза). Скрининг трансформированных дрожжевых клеток проводили в среде YPD с генетицином (G418) в конечной концентрации 100 мкг/мл.

В данной работе были использованы вектора и плазмиды представленные в таблице 1. Интегральный вектор pHO-poly-KanMX4-HO - любезно предоставлен профессором Дэвидом Стилманом (университет Юты, США), конститутивный вектор YEGAp - профессором Х. Кумагай (Киотский университет, Япония).

Таблица 1 – Плазмиды, использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
<i>HO-poly-KanMX4-HO</i>	Интегральный вектор, KanMX4	[16]
<i>HO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO</i>	Экспрессионный вектор для интеграции в <i>HO</i> локус генома дрожжей	[18]
YEGAp/ α - <i>cel7A</i> -myc-6xHis	pGAPDH- α - <i>cel7A</i> -myc-6xHis*tag-tGAPDH	[19]
YEGAp/ α - <i>bglI</i> -flag	pGAPDH- α - <i>bglI</i> -flag -tGAPDH	[20]

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma» (Германия), «Amresco» (США), «Applichem» (Германия), и «Реахим» (Удмуртия). А так же в ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (Германия), «New England Biolabs» (Франция), «Fermentas» (Польша), «Promega» (США), «Roche» (США).

Выделение геномной ДНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Инокулят дрожжевых клеток в 5 мл богатой среды YPD с антибиотиком G418 инкубировали в течение ночи при 30 °С. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин и осадок клеток отмывали предварительно охлажденной стерильной dH₂O. Далее клетки ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (2% Triton X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA) добавили равный объем хлороформ-изоамилового спирта (24:1) и 300 мг стеклянных бусинок, промытых в кислоте и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости в течение 3-4 мин с перерывами каждые 1 мин. Далее к лизату добавляли 200 мкл 1xTE, перемешали и

центрифугировали со скоростью 12000 об/мин при 4°C, 10 минут. Отбирали водную фазу и проводили экстракцию 2,5 объемом охлажденного изопропанола (-20 °С). Плавно перемешивали и инкубировали в морозильной камере в течение 30 минут. Препарат центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 минут. Затем супернатант сливали и осадок, содержащий нуклеиновые кислоты, подсушивали под вакуумом и растворяли в 400 мкл 1xTE с RNase для деградации РНК. Далее содержимое пробирки инкубировали 30 мин при 37 °С. После завершения времени инкубации добавили 10 мкл 4 М ацетата аммония, 2,5 объема % этанола и помещали на 30 мин на -20 °С. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 50 мкл dH₂O.

Полимеразная цепная реакция

Для аналитических и препаративных процедур использовали набор PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific #K0172, США). ПЦР-амплификацию проводили в следующем температурном режиме: денатурация – 94 °С – 1 мин, 30 циклов амплификации при 94 °С – 1 мин, 61°C – 30 сек, 72°C – 30 сек и заключительная элонгация при 72°C – 2 мин, 4°C 10 мин. Для определения эффективности интеграции методом ПЦР использовали специфические праймера (таблица 2).

Таблица 2 – Праймеры, использованные для анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции

Праймера	Последовательность
Pr-1	5'-GCGTTGTTACCACAACCTTTATGAG-3'
Pr-2	5'-TCTGAAAACACGACTATTCTGATGG-3'
Pr-4	5'-ATGAAGTTTCAGAGCACTCT-3'
Pr-5	5'-TCAAAGATATGCCTCCAGGA-3'
Pr-6	5'-GCGGCCGCCCCGGGATGAGATTCCTTC-3'
Pr-7	5'-GCGGCCGCTTAATTAAGGATCCTCAATGATGATGATG-3'
Pr-11	5'-AAGGATCCACTAGTCCGTAAGGGGAAGCGG-3'

Электрофоретическое разделение белков в ДСН-ПААГ и зимограмма

Разделение белков по молекулярной массе проводили электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли в денатурирующих условиях [21].

Белковые образцы готовили кипячением в 2x буфере для образцов (2x: 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0.02% бром-

фенолового синего, 20% глицерина) в течение 5 мин при 100 °С. Далее 15 мкг образца белка нанесли на 5% концентрирующий гель и проводили концентрацию белков при 80 V. Разделение белков осуществляли в 10% геле при 180 V. В качестве электродного буфера использовали стандартный Трис-глициновый буфер pH 8.3 (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM глицина, 0.1% SDS). После завершения электрофореза окрашивание

гели проводили при комнатной температуре в растворе кумасси (50% метанол, 10% уксусная кислота, 0.25% Coomassie Blue R-250) в течение 1ч. Далее декантировали раствор для окрашивания и добавляли отмывочный раствор (10% метанол, 5% уксусная кислота). Гель отмывали, легко взбалтывая и помешивая жидкость до тех пор, пока зоны, свободные от белков, не станут прозрачными.

Для определения целлюлазной активности ДСН-ПААГЭ зимограммой, белки были разделены в геле (12% акриламидом и 0.1% ДСН) содержащей 0.2% СМС. После электрофореза гель отмывали в 25% изопропанол с постоянным перемешиванием в течение 30 мин при комнатной температуре для удаления следов ДСН и ренатурации белков. Далее гель отмывали буфером (50 мМ натрий ацетатный рН 6.0) в течение 30 мин и инкубировали 2 ч в этом же растворе при 60°C оптимальной температуре для активности фермента. После инкубации окрашивали 0,5%-ным водным раствором Конго красного в течение ночи при 37 °С и отмывали раствором 1 М NaCl три раза по 5 мин при комнатной температуре. Активность рекомбинантных белков проявлялась в виде просветления вокруг белковых полос.

Иммуноблотинг

Определение экспрессии рекомбинантной плазмиды проводили методом иммуноблотинга. Белки из ДСН-ПААГ (12% акриламидом и 0.1% ДСН) перенесли на PVDF мембрану. После завершения переноса на мембрану, блокируем блот в TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6) растворе с 5% нежирным, сухим молоком на 30 минут на шейкере при комнатной температуре. Далее добавляем соответствующие разведенные первичные антитела (рекомбинантный CEL7A *L. edodes* инкубировали с коммерческими с-Мус-антителами 1:1000 (ABR Affinity BioReagents, США), а для рекомбинантного BGLI использовали антитела с коммерческими flag-антителами 1:10000 (Thermo Scientific, Канада) и инкубируем в 4 °С ON. По истечению времени инкубации (16 часов), мембрану отмываем трижды в растворе TBST (5-10 минут на шейкере). Добавляем подходящие вторичные антитела разведенные в TBST и оставляем на шейкере на 60 минут (поликлональные anti-sheep для с-Мус-антител 1:5000, моноклональные anti-mouse для flag-антител 1:20000). Затем снова отмываем трижды в растворе TBST и проявляем на пленке.

Определение выхода этанола

Содержание этанола анализировали согласно протоколу набора «Ethanol Kit» («Megazyme», США). Для этого дрожжевые культуры были выращены в SD-Trp средах, содержащих 20 г/л глюкозы, 20 г/л целлобиозы или 20 г/л глюкозы + 20 г/л целлобиозы, в течение 5 дней в анаэробных условиях. Концентрацию этанола измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм каждые 12 часов с момента посева клеток. Изначально в кюветы залили 2 мл дистиллированной воды, сверху добавили 100 мкл образца, при этом каждый раз прикрывая кюветы крышками во избежание испарения этанола. После последовательно в каждую кювету залили по 200 мкл «solution 1 (buffer)», 200 мкл «solution 2 (NAD+)», 50 мкл «solution 3 (Aldehyde dehydrogenase)» и хорошо перемешав, инкубировали при 20-25°C приблизительно 2 минуты, после чего измеряли абсорбцию (A1). Получив значения A1, к реакционной смеси добавили второй фермент «suspension 4 (Alcohol dehydrogenase)», и хорошо перемешав, инкубировали при 20-25 °С приблизительно 5-10 минут, после чего измеряли абсорбцию (A2). Полученные данные обрабатывали с помощью онлайн калькулятора Mega-CALC™.

Результаты и их обсуждения

Для создания рекомбинантной ДНК-конструкции, содержащей гены целлюбиогидролазы гриба *Lentinula edodes*, эндоглюконазы и β-глюкозидазы грибов рода *Aspergillus* использовали плазмиду *HO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO*, созданную нами на основе *HO-poly-KanMX4-HO* плазмиды. В качестве источника кассеты, содержащей последовательность, кодирующую целлюбиогидролазу *cel7A* гриба *L.edodes* под контролем промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) и GAPDH терминатора использовали YEGAP/*α-cel7A*-мус-*6xHis* [19]. Для создания вектора *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A*-мус-*6xHis*-KanMX4-*HO* экспрессирующего β-1,4-эндоглюканазу и целлюбиогидролазу с фланкированными гомологичными последовательностями к локусу *HO* эндонуклеазы, *PvuII* фрагмент плазмиды YEGAP/*α-cel7A*-мус-*6xHis*, содержащий *cel7A* ген *L.edodes* под контролем промотора GAPDH-*α-cel7A*-мус-*6xHis*-GAPDHt был клонирован в плазмиду *HO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO* [18] по *PacI* сайту предворительно обработанный

фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E.coli* для получения тупых концов и дефосфорилированному обработкой щелочной фосфата-

зой FastAP. В результате была создана рекомбинантная плазмида *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-KanMX4-HO*.

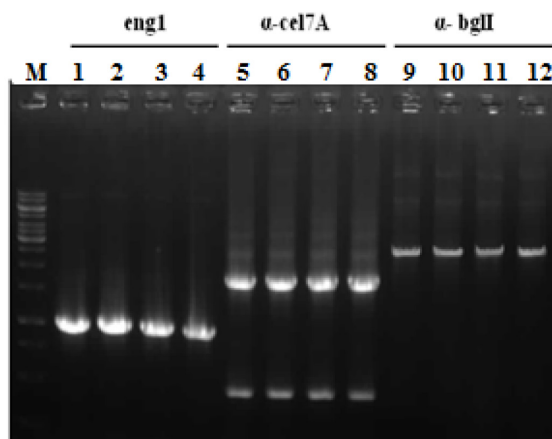


Рисунок 1 – Анализ рекомбинантной *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-myc-6xHis-GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO* на наличие вставки

Далее в корпус созданной нами рекомбинантной плазмиды *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO* клонировали кассету содержащую ген *bglI* слитый с сигнальным пептидом α -фактора дрожжей и flag-эпитопом под контролем конститутивного промотора и терминатора GAPDH. Для этого *HindIII* фрагмент рекомбинантной плазмиды YEGAP/ *α -bglI-flag* [20] обработали фрагментом Кленова для получения тупых концов и лигировали в корпус плазмиды *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-myc-6xHis-KanMX4-HO* предворительно порезанной по сайту рестрикции фермента *SmaI*, в результате которого была получена рекомбинантная плазмида *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-myc-6xHis-GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO*

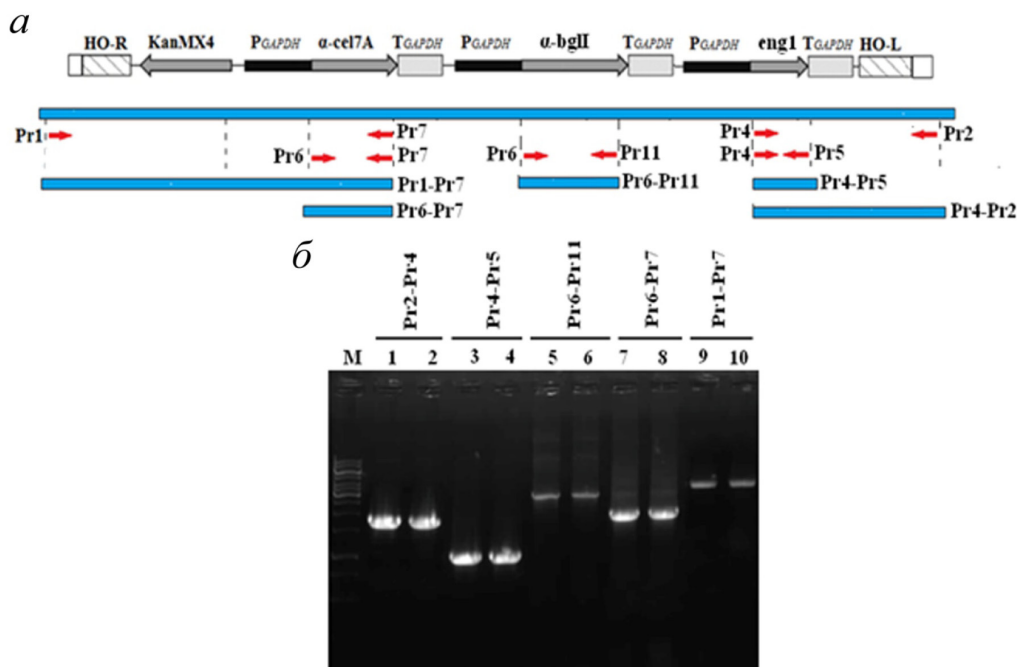
Рекомбинантные плазмиды проверяли на наличие вставок методом ПЦР с использованием генспецифических праймеров. Фрагменты, обнаруженные в результате агарозного гель-электрофореза полностью соответствовали длине клонированных генов *eng1*, *α -cel7A* и *α -bglI* (рисунок 1). В последующих экспериментах полученную рекомбинантную интегральную плазмиду *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-myc-6xHis-GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO* линеаризировали рестрикцией ферментами *SacII* и *SfoI* и использовали для трансформации клеток *S.cerevisiae* штамма FF18733. Скрининг трансформантов проводили в агаризованной YPD

в присутствии G418. Хромосомная интеграция кассеты с генами *eng1*, *α -cel7A* и *α -bglI* в *HO* локус генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР с применением праймеров представленных в таблице 2 и с использованием геномной ДНК рекомбинантных штаммов в качестве матрицы (рисунок 2).

В результате ПЦР с праймерами Pr2 (гомологичного к участку хромосомы фланкирующий *HO-L* локус) и антисмыслового ген специфического праймера Pr4 (комплементарна к 3'-концу *eng1*), как ожидалось, амплифицирован фрагмент ДНК размером около 2500 п.н (рисунок 2б, 1-2). Наличие гена 1,4- β -эндоглюканазы гриба *Aspergillus niger* в интегрированной кассете проверяли применением ген-специфических праймеров Pr4-Pr5 (рисунок 2б, 3-4). При использовании праймеров Pr6 (комплементарна к 3'-концу последовательности сигнального пептида) и Pr11 (комплементарна к 3'-концу кассеты с flag-эпитопом) обнаружился только один фрагмент длиной 2800 п.н (рисунок 2б, 5-6). В результате ПЦР с праймерами Pr6 и Pr7 (комплементарна к 3'-концу кассеты с *6xHis* хвостом) как ожидалось амплифицирован фрагмент ДНК размером около 1900 п.н (рисунок 2б, 7-8). При использовании праймеров Pr6 и Pr1 (гомологичного к участку хромосомы фланкирующий *HO-R* локус) был амплифицирован фрагмент длиной около 4000 п.н. Результаты этих экспериментов подтверждают эффективную интеграцию

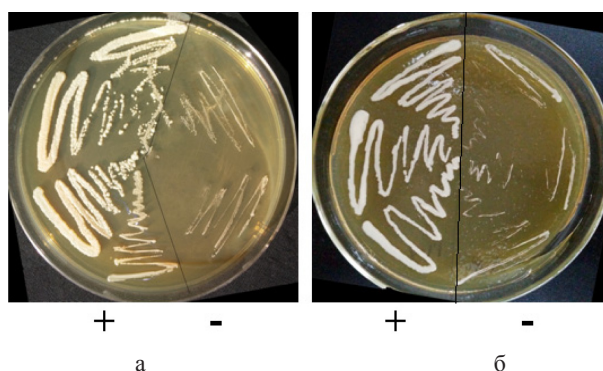
касеты *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis-GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO* в *HO* локус генома *S. cerevisiae*. Таким образом, нами полученные данные подтверждают эф-

фективную интеграцию сконструированной нами экспрессионной рекомбинантной кассеты, содержащей гены трех разных целлюлитических ферментов, в геномную хромосому *S. cerevisiae*.



а – Интегральный вектор *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis-GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO*, содержащий гены эндо-1,4- β -глюканазы, целлобиогидролазы и β -гликозидазы слитые с промотором глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). Размеры продуктов ПЦР указаны в тексте статьи. б – Продукты ПЦР полученные на матрице геномной ДНК с применением Pr1-Pr11 праймеров. М- ДНК маркер; 1-2- ПЦР продукты полученные с применением Pr2 и Pr4; 3-4- ПЦР продукты полученные с применением Pr4и Pr5; 5-6- ПЦР продукты полученные с применением Pr6, Pr11; 7-8- ПЦР продукты полученные с применением Pr6 и Pr7; 9-10- ПЦР продукты полученные с применением Pr1 и Pr7

Рисунок 2 – Анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции



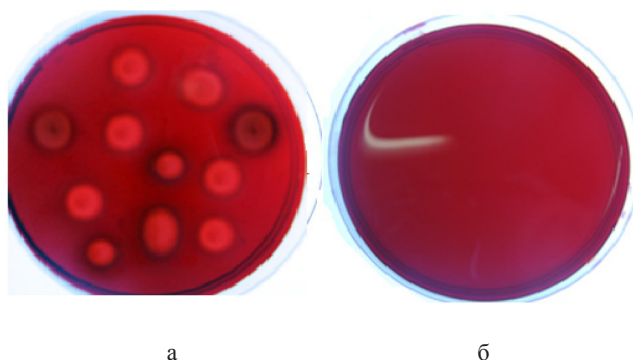
а – Скрининг рекомбинантных клеток *S.cerevisiae* FF 18733 - *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis- GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO* в среде с целлобиозой. б – Скрининг рекомбинантных клеток *S.cerevisiae* FF 18733 - *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis- GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO* в среде с КМЦ. «+» - клетки *S.cerevisiae* FF 18733 - *pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis- GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO*. «-» - не трансформированные клетки *S.cerevisiae*

Рисунок 3 – Скрининг рекомбинантных *S.cerevisiae* FF 18733-*pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis-GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO* на среде с целлобиозой или КМЦ

Способны ли нами сконструированные рекомбинантные штаммы использовать целлюлозу в качестве источника энергии? Для выяснения этого вопроса сконструированные штаммы дрожжей выращивали в среде содержащей целлобиозу или карбоксиметилцеллюлозу в качестве единственного источника углеводов (рисунок 3).

Как видно из рисунка рост рекомбинантных штаммов *S.cerevisiae* был обильным в среде с целлобиозой, так и в среде с КМЦ в качестве единственного источника энергии, тогда как рост не трансформированных клеток в этих условиях не наблюдался.

Кроме этого синтез 1,4- β -эндоглюканазы в рекомбинантных штаммах *S.cerevisiae* проверяли с помощью окрашивания 0,5% раствором Конго красный на агаризованной среде с КМЦ (рисунок 4). Как видно из рисунка вокруг колонии *S.cerevisiae* FF18733 – pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis-GAPDH- α -bgl1-flag-KanMX4-HO четко видны зоны просветления (рисунок 4а). Тогда как вокруг не трансформированных колоний *S. cerevisiae* зоны просветления не обнаруживалась (рисунок 4б). Эти данные указывают на то, что трансформированные клетки *S.cerevisiae* синтезируют и секретируют 1,4- β -эндоглюканазу гриба *Aspergillus niger*.



а – Анализ секреции 1,4- β -эндоглюканазы трансформированными клетками.
б – Анализ секреции 1,4- β -эндоглюканазы не трансформированными клетками

Рисунок 4 – Оценка эффективности секреции 1,4- β -эндоглюканазы рекомбинантными клетками, методом выявления эндоглюканазной активности

В последующих экспериментах мы решили проверить экспрессию каждого гена в рекомбинантных штаммах дрожжей. Экспрессию гена *cel7A* с мус-эпитопом и гена *bgl1* с flag-эпитопом проверяли с помощью иммуноблоттинга со специфическими антителами к мус- и flag-эпитопу, соответственно. Тогда как экспрессию эндоглюканазы *Aspergillus niger* решили проверить с помощью ДСН-ПААГ с последующим выявлением активности фермента на электрофореграмме. Как видно из данных представленных на рисунке 5а белковые фракции трансформированных и нетрансформированных клеток *S.cerevisiae* имели вытянутые размытые очертания на ДСН-ПААГ. По представленным данным определить белковые полосы с молекулярной массой, характерной для эндо-1,4- β -глюканазы, целлобиогидролазы и β -гликозидазы не представляется возможным. Однако, определение активности 1,4- β -эн-

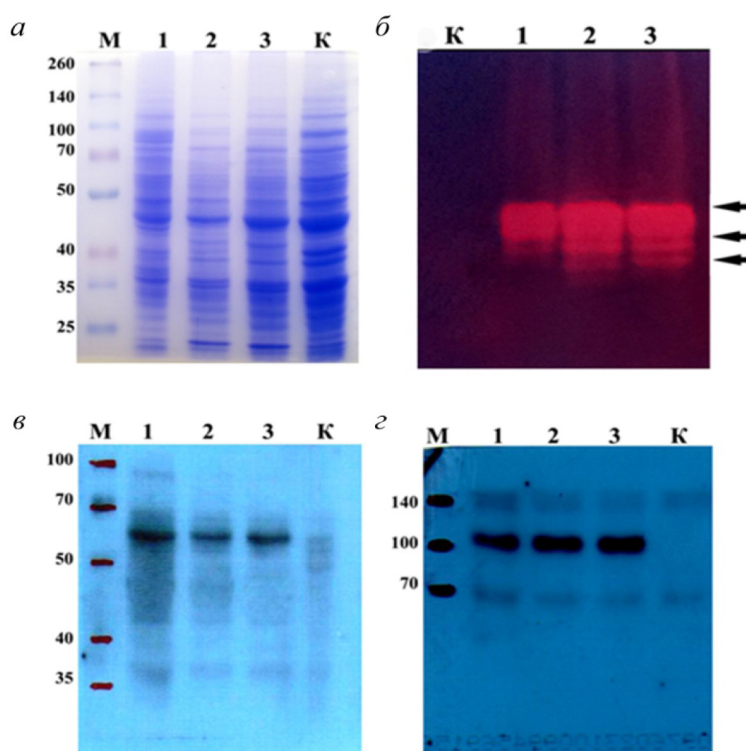
доглюканазы на ДСН-ПААГ выявила активные белковые зоны с молекулярной массой приблизительно 50 кДа и 70 кДа. Тогда как в не трансформированных клетках, похожие активные белковые зоны не обнаруживались (рисунок 5б). Молекулярная масса двух из трех обнаруженных белков в ДСН-ПААГ превышала расчетную молекулярную массу фермента, что указывает на то, что 1,4- β -эндоглюканаза в трансформированных дрожжевых клетках представлена разными гликоформами рекомбинантной 1,4- β -эндоглюканазы.

Для доказательства экспрессии рекомбинантного CEL7A *L. edodes* методом иммуноблоттинга белки из ДСН-ПААГ перенесли на PVDF мембрану и инкубировали с коммерческими с-Мус-антителами (*ABR Affinity BioReagents, США*). Иммуноблоттинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной

массой незначительно большей, чем рассчитанная молекулярная масса CEL7A (рисунок 5в). Тогда как белки, полученные из не трансформированных клеток, не содержали белковой полосы с искомой массой.

Для доказательства экспрессии рекомбинантного BGLI использовали иммуноблоттинг с коммерческими *flag-антителами* (*Thermo Scientific, Канада*). Как видно из результатов, приведенных на рисунке 5г белки, полученные из не трансформированных клеток *S.cerevisiae*

ciae не имеют белковой полосы с искомой молекулярной массой. Тогда как белки трансформированных рекомбинантной конструкцией FF18733-pHO-GAPDH-*eng1*-GAPDH- α -*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDH- α -*bglI*-flag-KanMX4-HO дрожжей показывали при иммуноблоттинге белок с молекулярной массой около 100 кДа, что соответствует массе BGLI (рисунок 5з), следовательно эти данные указывают на эффективную экспрессию рекомбинантных CEL7A и BGLI в *S. cerevisiae*.



а – ДСН-ПААГЭ белков клеточного экстракта. б – Анализ экспрессии рекомбинантной эндоглюканызы. в – Анализ экспрессии рекомбинантной целлюбиогидролазы. г – Анализ экспрессии рекомбинантной β -гликозидазы.

М – маркер; 1-3 – клоны трансформированных клеток; К – не трансформированная клетка

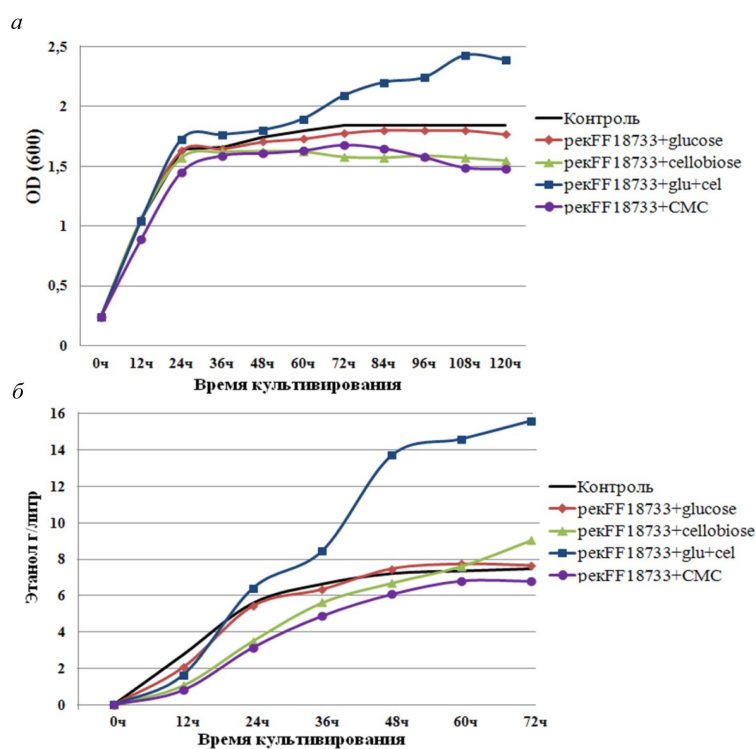
Рисунок 5 – Анализ экспрессии рекомбинантных белков клетками FF18733-pHO-GAPDH-*eng1*-GAPDH- α -*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDH- α -*bglI*-flag-KanMX4-HO

В последующих экспериментах мы исследовали скорость роста сконструированных нами рекомбинантных дрожжей. Для этого дрожжи выращивали в YPD среде, содержащей карбоксиметилцеллюлозу или целлюбиозу в качестве единственного источника углеводов. Кроме этого, рекомбинантные дрожжи также выращивали в YPD среде содержащей целлюбиозу и глюкозу. Для сравнения эффективности роста рекомбинантных штаммов дрож-

жей в среде с целлюлозой в качестве контроля использовали нетрансформированные клетки, выращенные в YPD среде с глюкозой (Контроль). Рекомбинантный штамм не демонстрировал существенных отличий от родительского нетрансформированного штамма (в среде с глюкозой) по скорости роста и выходу биомассы (рисунок 6а). Во-первых это указывает на отсутствие негативного влияния синтеза рекомбинантных белков в дрожжах F18733-

pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis-GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO. Во-вторых, нами созданные рекомбинантные штаммы с высокой эффективностью могут использовать

целлюлозу в качестве источника энергии, за счет эффективной работы, интегрированных в хромосому дрожжей, генов целлюлитических ферментов.



а – Определение скорости роста рекомбинантного штамма *S. cerevisiae*. *б* – Определение выхода этанола во время ферментации субстрата рекомбинантным штаммом *S. cerevisiae*

Рисунок 6 – Исследования физиологических характеристик рекомбинантного штамма FF18733-*pHO-GAPDH-eng1-GAPDH- α -cel7A-мус-6xHis-GAPDH- α -bglI-flag-KanMX4-HO*

В последующих экспериментах мы определяли выход этанола в среде содержащей 20% целлобиозу или 20% карбоксиметилцеллюлозу в качестве единственного источника углеводов (Рис. 6б). Для сравнения эффективности выхода этанола в ходе ферментации целлюлозных субстратов (целлобиоза и карбоксиметилцеллюлоза), параллельно нетрансформированные клетки инкубировали в среде с 2% глюкозой (Контроль). Полученные данные указывают на то, что способность продуцировать этанол в обогащенной среде с целлобиозой или карбоксиметилцеллюлозой, повышается по мере увеличения времени инкубации.

Интересно отметить, выход этанола производимые рекомбинантными дрожжами в среде с целлобиозой или карбоксиметилцеллюлозой были сравнимы с количеством этанола произ-

водимыми нетрансформированными клетками дрожжей в среде с 2% глюкозой.

Рекомбинантные дрожжи, выращенные в среде с целлобиозой, через 24 ч продуцировали 4 г этанола на литр, после 72 часов - 9 г этанола на литр. Рекомбинантные дрожжи, выращенные в среде с карбоксиметилцеллюлозой, через 72 часа продуцировали 7 г этанола на 1 литр. Тогда как нетрансформированные родительские штаммы дрожжей, выращенные в среде с глюкозой, продуцировали этанол в количестве 8 г этанола на 1 литр. Кроме того, рекомбинантные штаммы, выращенные в среде, содержащей целлобиозу и глюкозу, показали более высокий выход этанола (15,6 г/л).

Таким образом, в результате проведенных нами работ был получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, содержащий в геноме гены

целлюбиогидролазы гриба *Lentinula edodes*, *pergillus*, а также эффективный для ферментации эндоглюканазы и β -гликозидазы грибов рода *As-* целлюлозы в этанол.

Литература

- 1 Блинов И.П. Химия микробных полисахаридов. – Москва: Высшая школа. – 1984. – 162 с.
- 2 Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*. – дисс. ... канд. хим. наук. – Москва, 2006. – 176 с.
- 3 Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme // *Appl Environ Microbiol.*- 2004.- №70.- P.1207-1212.
- 4 Wen F., Sun J., Zhao H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol // *Appl Environ Microbiol.*- 2010.- №76.- P.1251-1260.
- 5 Yanase S., Yamada R., Kaneko S., Noda H., Hasunuma T., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A. Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast // *Biotechnol J.*- 2010.- №5.- P. 449-455.
- 6 Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // *Biotechnol Adv.* - 2000. - №18. - P.355-383.
- 7 Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // *Current Opinion in Biotechnology.*- 2005.- №16.- P.577-583.
- 8 Van Rensburg R., Van Zyl W.H., Pretorius I.S. Engineering yeast for efficient cellulose degradation // *Yeast.* - 1998. - №14. - P. 67-76.
- 9 Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme // *Appl Environ Microbiol.*- 2004.- №70.- P.1207-1212.
- 10 Yamada R., Hasunuma T., Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing // *Biotechnol Adv.*- 2013.- №31.- P.754-763.
- 11 Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Kondo A. Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast // *Appl Microbiol Biotechnol.*- 2010.- №88.- P. 849-857.
- 12 Sakai A., Shimizu Y., Hishinuma F. Integration of heterologous genes into chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty // *Appl Microbiol Biotechnol.*- 1990.- №3.- P. 302-306.
- 13 Kim M.D., Rhee S.K., Seo J.H. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal delta-integration // *J Biotechnol.* - 2001. - №85. - P. 41-48.
- 14 Kim J.H., Kim H.R., Lim M.H., Ko H.M., Chin J.E., Lee H.B., Kim I.C., Bai S. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, α -amylase and debranching enzyme // *Biotechnol Lett.*- 2010.- №32.- P. 713-719.
- 15 Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H. Cocktail delta-integration: a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains // *Microb Cell Fact.*- 2010.- №9.- P. 32.
- 16 Voth W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the HO locus // *Nucleic Acids Res.* - 2001.- №29.- P. 59.
- 17 Herskowitz I., Rine J., Strathern J. Mating type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae* / Jones E.W., Pringle J.R., Broach J.R. etc. // *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression – NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992. – P. 583-656.*
- 18 Тайпакова С.М., Смекемов И.Т., Сапарбаев М.К. and Бисенбаев А.К. Characterization of *Aspergillus niger* endo-1,4- β -glucanase ENG1 secreted from *Saccharomyces cerevisiae* using two different expression vectors // *Genetics And Molecular Research.*- 2015.- №2.- P. 6439-6452.
- 19 Тайпакова С.М., Смекемов И.Т., Бисенбаев А.К. Создание рекомбинантного штамма *Saccharomyces cerevisiae* с геном целлюбиогидролазы гриба *Lentinula edodes* в HO локусе хромосомы // *Вестник КазНУ.* – 2014. - №2. – С. 352 – 355.
- 20 Смекемов И.Т., Куанбай А.К., Бурибаева А.С., Тайпакова С.М., Бисенбаев А.К. Экспрессия кДНК β -гликозидазы гриба *Thermoascus aurantiacus* в *S. cerevisiae* // *Доклады НАН РК.* – 2016. - №3. – С.11.
- 21 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* - 1970. - №227. P. 680-685.

References

- 1 Blinov IP (1984) Chemistry of microbial polysaccharides [Khimiya mikrobnikh polisakharidov]. Vischaya schkola, Moscow, Russia, pp. 162. (In Russian)
- 2 Skomarovskii AA (2006) Component composition and hydrolytic ability of *Penicillium verruculosum*'s ferment complex [Komponentnii sostav I gidroliticheskaya sposobnost fermentnogo kompleksa *Penicillium verruculosum*] Diss. of the cand. of chem. sci., MSU, Moscow, Russia, pp. 176. (In Russian)
- 3 Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H, Kondo A (2004) Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme, *Appl Environ Microbiol*, 70:1207-1212. DOI: 10.1128/AEM.70.2.1207-1212.2004

- 4 Wen F, Sun J, Zhao H (2010) Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol, *Appl Environ Microbiol*, 76:1251-1260. DOI: 10.1128/AEM.01687-09
- 5 Yanase S, Yamada R, Kaneko S, Noda H, Hasunuma T, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A (2010) Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast, *Biotechnol J*, 5: 449-455. DOI: 10.1002/biot.200900291
- 6 Bhat MK (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol Adv*, 18:355-383. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00041-0
- 7 Lynd LR, van Zyl WH, McBride J E, Laser M (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update, *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 577-583. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.08.009
- 8 Van Rensburg R, Van Zyl WH, Pretorius IS (1998) Engineering yeast for efficient cellulose degradation. *Yeast*, 14: 67-76. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1<67::AID-YEA200>3.0.CO;2-T
- 9 Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H, Kondo A (2004) Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme, *Appl Environ Microbiol*, 70:1207-1212. DOI: 10.1128/AEM.70.2.1207-1212.2004
- 10 Yamada R, Hasunuma T, Kondo A (2013) Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing, *Biotechnol Adv*, 31: 754-763. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.02.007
- 11 Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Kondo A (2010) Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast, *Appl Microbiol Biotechnol*, 88: 849-857. DOI: 10.1007/s00253-010-2850-6
- 12 Sakai A, Shimizu Y, Hishinuma F (1990) Integration of heterologous genes into chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty, *Appl Microbiol Biotechnol*, 3: 302-306. DOI: 10.1007/BF00164526
- 13 Kim MD, Rhee SK, Seo JH (2001) Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal delta-integration, *J Biotechnol*, 85: 41-48. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00376-X
- 14 Kim JH, Kim HR, Lim MH, Ko HM, Chin JE, Lee HB, Kim IC, Bai S (2010) Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, α -amylase and debranching enzyme, *Biotechnol Lett*, 32: 713-719. DOI: 10.1007/s10529-010-0212-1
- 15 Yamada R, Taniguchi N, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H (2010) Cocktail delta-integration: a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains, *Microb Cell Fact*, 9: 32. DOI: 10.1186/1475-2859-9-32
- 16 Voth WP, Richards JD, Shaw JM, Stillman DJ (2001) Yeast vectors for integration at the HO locus, *Nucleic Acids Res*, 29: 59. DOI: 10.1093/nar/29.12.e59
- 17 Herskowitz I, Rine J, Strathern J (1992) Mating type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression* (Jones, E.W., Pringle, J.R., Broach, and J.R. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 583-656.
- 18 Taipakova SM, Smekenov IT, Saparbaev MK and Bissenbaev AK (2015) Characterization of *Aspergillus niger* endo-1,4- β -glucanase ENG1 secreted from *Saccharomyces cerevisiae* using two different expression vectors, *Genetics And Molecular Research*, 2: 6439-6452. DOI: 10.4238/2015
- 19 Taipakova SM, Smekenov IT, Bisenbaev AK (2014) Construction a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with cellobiohydrolase gene from fungus *Lentinula edodes* in HO locus of chromosome, *Bulletin of KazNU, Biology series* [Sozdanie rekombinantnogo shtamma *Saccharomyces cerevisiae* s genom tsellobiogidrolazyi griba *Lentinula edodes* v HO lokuse hromosomyi, *Vestnik KazNU, Seriya Biologiya*] 2: 352 – 355. (In Russian)
- 20 Smekenov IT, Kuanbai AK, Buribaeva AS, Taipakova SM, Bisenbaev AK (2016) Expression of β -glucosidase cDNA of fungus *Thermoascus aurantiacus* in *S.cerevisiae*, *Reports of the NAS RK* [Ekspressiya kdnk β -glucozidazi griba *Thermoascus aurantiacus* v *S. cerevisiae*. *Doklady NAN RK*] 3: 11. (In Russian)
- 21 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685. DOI:10.1038/227680a0