

- 4 Sarbassov D., Guertin D., Ali S., Sabatini D. // Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex // *Science*. – 2005. – V. 307. – P.1098-1101.
- 5 Wullschlegel S., Loewith R., Hall M. TOR signaling in growth and metabolism // *Cell*. – 2006. – V.124. – P. 471–484.
- 6 Anderson G. TOR signaling in plants // *Plant Cell Monographs*. – 2008. – V.10. – P.243-259.
- 7 Moreau M., Sormani R., Menand B., Veit B., Robaglia C., Meyer C. The TOR complex and signaling pathways in plants // *Enzymes*. – 2010. – V.27. – P.285-302.
- 8 John F., Roffler S., Wicker T., Ringli C. Plant TOR signaling components // *Plant Signalling and Behavior*. – 2011. – V.6. – N.11. – P. 1700-1705.
- 9 Deprost D., Yao L., Sormani R., Moreau M., Leterreux G., Nicola M., Bedu M., Robaglia C. and Meyer C. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation // *EMBO Rep*. – 2007. – V. 8. – P. 864–870.
- 10 Milborrow B.V. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis // *Journal of Experimental Botany*. – 2001. – V. 52. – P. 1145-1164.
- 11 Seo M., Koiwai H., Akaba S., Komano T., Oritani T., Kamiya Y., Koshiba T. Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal*. – 2000. – V. 23. – P. 481–488.

УДК. 577.216.3; 577.218

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

НИИ проблем биологии и биотехнологии, Казахский Национальный университет имени аль-Фараби,
г. Алматы, Казахстан

*e-mail: amangeldy.bissenbaev@kaznu.kz

Создание рекомбинантного штамма *Saccharomyces cerevisiae* с геном эндо- β -1, 4-эндоглюконазы гриба *Aspergillus niger* в НО локусе хромосомы

Создан интегральный вектор способный включаться в НО локус хромосомы с селективным маркерным геном устойчивости к генетицину (G418), конститутивным промотором и терминатором дрожжевой глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). С использованием вектора для геномной интеграции получены новые штаммы дрожжей эффективно экспрессирующие эндо-1,4- β -глюканазу гриба *Aspergillus niger*. Показано, что подходы, использованные в данной работе, могут быть перспективными для конструирования промышленных штаммов для ферментации целлюлозосодержащего сырья.

Ключевые слова: эндо-1,4- β -глюканаза, *Saccharomyces cerevisiae*, геномная интеграция, экспрессия гена, ферментативная активность, гликозилирование.

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

Хромосомасының НО локусында *Aspergillus niger* саңырауқұлағының эндо- β -1, 4-эндоглюконаза гені бар рекомбинантты *Saccharomyces cerevisiae* штаммын алу

Жұмыс барысында генетицинге (G418) төзімділік көрсететін маркерлік ген KanMX4 пен ашытқы глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH) генінің конститутивті промоторы мен терминаторына ие, хромосоманың НО локусына интеграциялануға қабілетті интегральді вектор құрастырылды. Интеграцияланушы векторларды қолдана отырып, *Aspergillus niger* саңырауқұлағының эндо-1,4- β -глюканаза ферментін эффективті түрде экспрессиялауға қабілетті жаңа ашытқы штаммдары алынды. Аталмыш жұмыста қолданылған амалдардың целлюлозалы шикізатты ферментациялауға қабілетті өндірістік штамдарды құрастыруда тиімділігі көрсетілді.

Түйін сөздер: целлюбогидролаза, эндо-1,4- β -глюканаза, *Saccharomyces cerevisiae*, ген экспрессиясы, ферментативтік белсенділік, гликозилдену.

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

Construction of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains containing endo-1,4- β -glucanase gene of *Aspergillus niger* into the chromosomal HO locus

The vector carrying a selective marker gene resistant to geneticin (G418), a constitutive promoter and terminator of yeast gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was created for integration of genetic material into the chromosomal HO locus. Through the use of a genomic integration vector, new yeast strains with efficient expression of endo-1,4- β -glucanase of the fungus *Aspergillus niger* were obtained. Approaches used in this study has been shown to be perspective in the development of industrial strains for the fermentation of cellulose-containing materials.

Keywords: cellobiohydrolase, endo-1,4- β -glucanase, *Saccharomyces cerevisiae*, gene expression, enzymatic activity, glycosylation.

Целлюлоза является наиболее распространенным биологическим полимером. Она представляет собой линейный полимер, ангидрогликозные звенья, которых связаны β -1,4-гликозидными связями. В зависимости от растительного источника степень полимеризации нативной целлюлозы может составлять более 10 тыс., а молекулярная масса – более 1,5 млн. [1]. Деструкция целлюлозы с образованием растворимых сахаров осуществляется под действием полиферментной системы целлюлаз, включающей в себя эндо-1,4- β -гликоназы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4- β -гликоназы (КФ 3.2.1.91), экзо-1,4- β -гликозидазы (КФ 3.2.1.74) и целлобиазы (КФ 3.2.1.21). Свойства индивидуальных ферментов, а также их взаимодействие в составе целлюлазного комплекса определяют эффективность гидролиза целлюлозосодержащих субстратов [2].

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 [3]. 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 [4].

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* [5]. Кроме этого создан рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* коэкспрессирующий три целлюлитических фермента (экзо-1,4- β -гликоназы, эндо-1,4- β -гликоназы и 1,4- β -гликозидазы) и способный конвертировать аморфную целлюлозу в этанол [6]. Однако, во всех выше перечисленных работах в качестве экспрессирующего вектора использовались эписомные, или плазмидные вектора. Известно, что данный тип плазмид обычно трудно стабильно поддерживать в клетках, и они часто теряются из трансформированных клеток. Для того, чтобы поддерживать цепь ДНК генов целлюлитических ферментов в дрожжах в более стабильном состоянии, ее следует вставить в геном дрожжей.

Ворт с соавторами [7] 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, ответственного за превращение клетки в клетку противоположного типа спаривания и инициирует диплоидизацию гаплоидных клеток [8]. Показано что, *HO* locus не требуется для роста дрожжей и практически все лабораторные и промышленные штаммы *S. cerevisiae* имеют мутации в данном локусе. К сожалению, интегральные векторы, описанные, в данной работе не содержат промоторы, и могут быть использованы только для интеграции генов с собственными промоторами.

В настоящей работе создан рекомбинантный штамм *Saccharomyces cerevisiae* эффективно экспрессирующий ген эндо-1,4- β -эндогликоназы гриба *Aspergillus niger* в *HO* локусе хромосомы.

Материалы и методы

Штаммы и плазмиды. Бактериальные клетки *E. coli* штамма *DH5 α* (F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR purG Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -) из лабораторной коллекции использовали для клонирования рекомбинантных плазмид.

В клетках *S. cerevisiae* штамма FF18733 (*MATa his7-2 leu2-3,112 lys1-1 trp1-289 ura3-52*) осуществляли экспрессию клонированного гена. 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.

Конструкция плазмиды РЦ-ПФЗВР-ymn1-ЛфтмЧ4-РЦю Для создания дрожжевого экспрессионного вектора использовали плазмиду HO-poly-KanMX4-HO, содержащий селективный маркер KanMX4 и два фрагмента HO гена для интеграции в HO locus генома дрожжевой клетки, любезно предоставленный профессором Дэвидом Стилманом, университет Юты, США [7]. В качестве источника кассеты, содержащей последовательность, кодирующую β -1,4-эндогликоканазу (*eng1*) *A. niger* под контролем промотора глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) и GAPDH терминатора использовали YEGAp/*eng1* [9], которую любезно предоставил профессор X.

Кумагай, Киотский университет, Япония. Для создания вектора рНО-GAPDH-*eng1*-KanMX4-НО экспрессирующего β -1,4-эндоглюканазу с фланкированными гомологичными последовательностями к локусу НО эндонуклеазы, HindIII фрагмент плазмиды YEGAp/*eng1*, содержащий *eng1* ген *Aspergillus* под контролем промотора GAPDH-*eng1*-GAPDHt был обработан фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* для получения тупых концов и клонирован по тупому и дефосфорилированному сайту SmaI плазмиды HO-poly-KanMX4-НО (Рисунок 1).

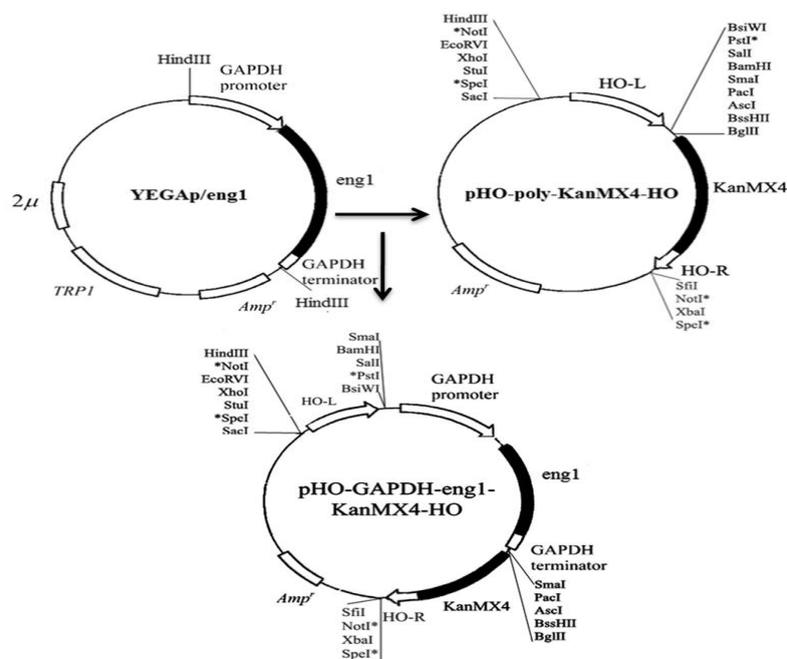


Рисунок 1 – Схема создания вектора рНО-GAPDH-*eng1*-KanMX4-НО

Сконструированная рНО-GAPDH-*eng1*-KanMX4-НО ДНК была линейаризована обработкой ферментами рестрикции EcoRV и XbaI и трансформирована стандартным литий ацетатным методом в клетки *S. cerevisiae* штамма FF18733. Для скрининга трансформированных дрожжевых клеток, несущих ген резистентности к G418 использовали питательную среду YPD, содержащую стерилизованный методом фильтрации G418 (100мкг/мл).

Трансформированные дрожжевые клетки с β -1,4-эндоглюканазной активностью были отобраны на агаризованной среде YPD с 0.5% КМЦ и G418 (100мкг/мл) методом окрашивания конго красным. Эффективность интеграции в НО локус хромосомы определяли с помощью ПЦР со специфическими праймерами (таблица 1).

Таблица 1 – Последовательность праймеров использованных для анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции

Праймер	Последовательность
Pr-1	5'- GCGTTGTTACCAACTCTTATGAG-3'
Pr-2	5'- TCTGAAAACACGACTATTCTGATGG-3'
Pr-3	5'-GGAGGCCCAAGAATACCCCTCCTTGA-3'
Pr-4	5'-ATGAAGTTTCAGAGCACTCT -3'
Pr-5	5'-TCAAAGATATGCCTCCAGGA -3'

Определение эндо-1,4- β -глюканазной активности. Трансформированные клетки культивировали в течение ночи в 20 мл среды YPD, содержащей G418. Затем ночную культуру инокулировали в 1000 мл свежей среды с генетицином (100мкг/мл) и КМЦ в конечной концентрации 0,1% и культивировали при 30 °С в течение 5 суток. Каждые 24 часа снимали по 200мл культуры клеток и осаждали центрифугированием в течение 7 мин при 3000g, 20°С. Супернатант, содержащий

сектерлируемые белки, центрифугировали повторно. Клетки ресуспендировали в 50мМ натрий ацетатном буфере и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости с добавлением обработанных кислотой стеклянных бусинок диаметром 0,45мм. Клеточный лизат центрифугировали при 14000g в течение 30 мин. Супернатант и культуральную жидкость использовали в качестве источника эндоглюканаза.

Метод определения эндоглюканазной активности с применением 3,5-динитросалициловой кислоты. Определение эндоглюканазной активности с использованием карбоксиметилцеллюлозы в качестве субстрата проводили путем измерения количества восстанавливающихся сахаров с применением 3,5-динитросалициловой кислоты согласно методу Миллера и соавторов [10] с некоторыми модификациями.

К 1 мл культуральной жидкости, предворительно подогретой при 60 °С в течение 5 мин добавили 1 мл субстрата (2% КМЦ в 100мМ натрий ацетатном буфере рН 6) и инкубировали в течение 60 мин при 60 °С. Реакцию остановили добавлением 3 мл реагента с динитросалициловой кислотой и кипячением в течение 15 минут. После пробирки перенесли в баню с холодной, ледяной водой для быстрого охлаждения. Далее развели в воде (0,2 мл реакционной смеси+2,5 мл dH₂O) и адсорбцию раствора измеряли при 540 нм на спектрофотометре Apel PD303 UV. За единицу активности принимали количество фермента, приводящий к образованию 1мкМ восстанавливающихся сахаров за 1 мин (на1 мл тотального белка) при данных условиях реакции.

Электрофорез. Разделение белков по общему заряду (нативный ПААГ) и молекулярной массе (ДСН-ПААГ электрофорез) проводили согласно методу Дэвиса [11] и Лэммли [12]. Нативный ПААГ электрофорез проводили при комнатной температуре в течение 1-2 часов при 20 мА в 10% ПААГ, содержащей КМЦ в концентрации 0,2% и 5% концентрирующем геле в системе для электрофореза Mini-Protean Tetra Cell. После электрофореза гель с СМС инкубировали 2 ч в 50мМ натрий ацетатном буфере рН-6 при 60°С - оптимальной температуре для активности эндоглюканазы. Окраску геля проводили 0,5%-ным водным раствором Конго красного в течение ночи при 37 °С. После окрашивания гель отмывали раствором 1М NaCl три раза по 5 мин при комнатной температуре. Эндоглюканазная активность проявлялась в виде желтоватой зоны просветления, хорошо различимой на красном фоне.

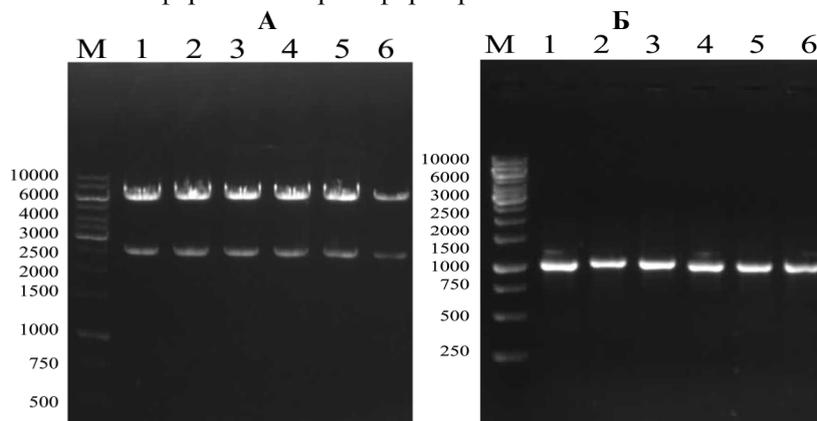
ДСН-ПААГ проводили в геле с 12% акриламидом и 0.1% ДСН с использованием Трис-глициновой буферной системы. Для определения целлюлазной активности ДСН-ПААГ электрофорезом, белки были разделены в геле (12% акриламидом и 0.1% ДСН) содержащей 0.2% КМЦ. После электрофореза гель отмывали в 25% изопропанолем 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) в течение 30 мин и инкубировали 2 ч в этом же растворе при 60°С. Далее гель окрашивали 0,5%-ным водным раствором Конго красного в течение ночи при 37°С и отмывали раствором 1М NaCl три раза по 5 мин при комнатной температуре. Активность рекомбинантных белков проявлялась в виде просветления вокруг белковых полос.

Результаты и их обсуждение

Для создания дрожжевого штамма с 1,4-β-эндоглюканазной активностью, была создана HO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO экспрессионный интегральный вектор (см. раздел «материалы и методы исследования»). Продукт лигирования трансформировали в DH5a штамм *E. coli*. Для идентификации рекомбинантного вектора проводили рестрикционный анализ по сайтам BamHI и BglIII. В результате рестрикции на агарозном геле обнаружили два фрагмента ДНК с ожидаемыми размерами около 2.8 и 6 тпн (Рисунок 2А).

В данной работе для переноса созданного нами HO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO экспрессионного интегрального вектора выбран *S. cerevisiae* штамм FF18733. Применение *S. cerevisiae* для производства этанола из гексозных сахаров (в частности глюкозы) широко распространена в промышленности. Дрожжи *S. cerevisiae* обладают многими положительными качествами, делающими их подходящим объектом для промышленного использования в производстве биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья. *S. cerevisiae* могут с высокой эффективностью производить этанол из глюкозы (3,3 г/л в час) и толерантна к высоким содержаниям этанола в культуральной среде. Кроме этого *S. cerevisiae* входит в список организмов, признанных безопасными (GRAS, generally recognized

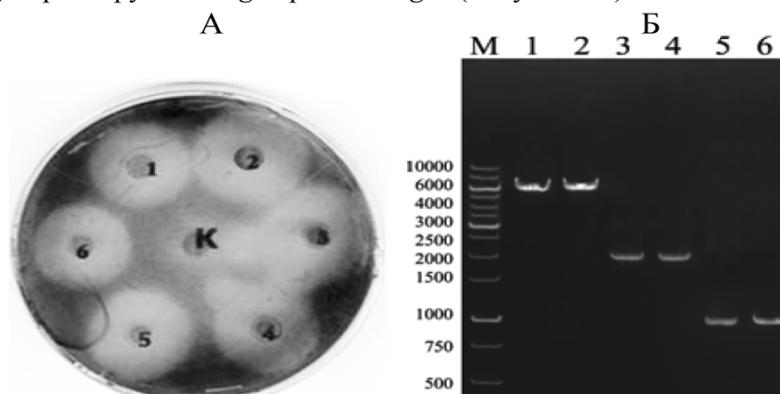
as safe). Дрожжи *S. cerevisiae* не способны синтезировать 1,4-β-эндоглюканазу, что намного облегчает регистрацию рекомбинантного фермента в трансформированных клетках.



А – Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды, В – ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды, М – ДНК маркер, 1-6 – клоны рекомбинантных плазмид

Рисунок 2 – Идентификации рекомбинантного вектора рНО-GAPDH-eng1-KanMX4-НО

Рекомбинантная плаزمида также проверялась с помощью ПЦР с специфическими праймерами к *engI*. В результате был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около 1000 п.н, что полностью соответствует размеру гена *engI* гриба *A. niger* (Рисунок 2В).



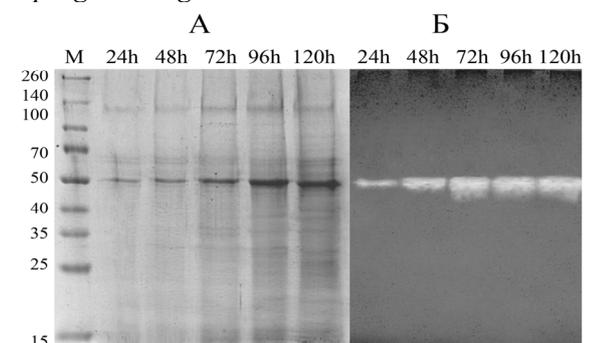
А – Анализ трансформированных клеток на свойство секреции гENG1, 1-6- рекомбинантные клетки *S. cerevisiae* несущие НО-GAPDH-*engI*-KanMX4-НО кассету в НО локусе генома, К – трансформированная клетка *S. cerevisiae* несущая НО-poly-KanMX4-НО кассету в НО локусе генома, Б – Продукты ПЦР полученные на матрице геномной ДНК с применением Pr1-Pr5 праймеров, М – ДНК маркер, 1-2 – ПЦР продукты полученные с применением Pr1 и Pr2, 3-4 – ПЦР продукты полученные с применением Pr1 и Pr3, 5-6 – ПЦР продукты полученные с применением Pr4, Pr5

Рисунок 3 – Анализ эффективности интеграции рекомбинантной конструкции

В связи с этим для оптимизации интеграции в геном, конструкция рНО-GAPDH-*engI*-KanMX4-НО была линейаризована обработкой ферментами рестрикции *EcoRV* и *XbaI* и использована для трансформации клеток *S. cerevisiae* штамма FF18733. Скрининг трансформантов проводили в агаризованной среде YPD в присутствии антибиотика G418. Кроме этого рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* экспрессирующие 1,4-β-эндоглюканазу выявляли с помощью окрашивания 0,5% раствором Конго красный на агаризованной среде с КМЦ (Рис. 3А). Как видно из рисунка вокруг колонии *S. cerevisiae* трансформированных рНО-GAPDH-*engI*-KanMX4-НО четко видны

зоны просветления. Тогда как, вокруг трансформированных с НО-poly-KanMX4-НО колонии *S. cerevisiae* зоны просветления не обнаруживалась. Эти данные указывают на то, что

трансформированные клетки *S. cerevisiae* синтезируют и секретируют 1,4- β -эндоглюканазу гриба *Aspergillus niger*.



А – ДСН-ПААГ электрофорез секретируемых белков *S. cerevisiae* трансформированных рНО-GAPDH-eng1-KanMX4-НО в течение 5 суток; В – ДСН-ПААГ зимограмма секретируемых белков *S. cerevisiae* трансформированных рНО-GAPDH-eng1-KanMX4-НО в течение 5 суток; М – маркер массы белка; 24-120h – время культивирования в часах

Рисунок 4 – Анализ накопление различных форм рекомбинантной 1,4- β -эндоглюканазы в зависимости от времени культивирования

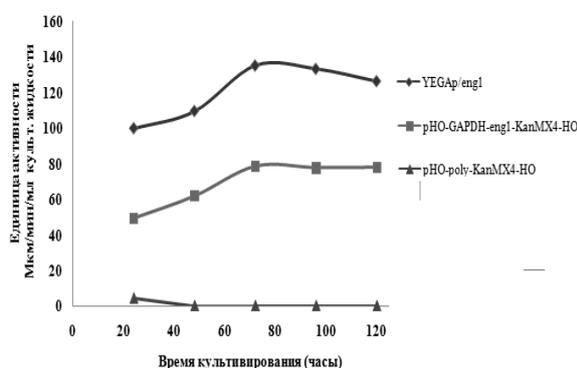


Рисунок 5 – Эндо-1,4- β -глюканазная активность ферментов секретируемых в культуральную среду

Хромосомная интеграция последовательности с геном *eng1* в НО locus генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР с применением праймеров представленных в таблице 1 и с использованием геномной ДНК позитивных рекомбинантных штаммов в качестве матрицы (Рис. 3Б). В результате ПЦР с праймерами Pr1 и Pr2, гомологичных к участкам хромосомы фланкирующие НО locus, как ожидалось амплифицирован фрагмент ДНК размером около 6000 п.н. (Рисунок 3Б, 1-2). При использовании праймеров Pr1 и Pr3 (Pr3 гомологична к участку KanMX4 гена) обнаружился только один фрагмент длиной 2000 п.н (Рисунок 3Б, 3-4). Наличие гена 1,4- β -эндоглюканазы гриба *A. niger* в интегрированной кассете проверяли применением ген-специфических праймеров Pr4- Pr5 (Рис 3Б, 5-6). Результаты этих экспериментов подтверждают эффективную интеграцию кассеты рНО-GAPDH-*eng1*-KanMX4-НО в НО locus генома *S. cerevisiae*.

Как отмечалось выше, 1,4- β -эндоглюканаза гриба *Aspergillus niger* в трансформированных клетках *S. cerevisiae* не только синтезируются, но и эффективно секретируются в культуральную среду (Рисунок 3А). В связи с этим экспрессию гена эндо-1,4- β -глюканазы в трансформированных плазмидой рНО-GAPDH-eng1-KanMX4-НО клетках *S. cerevisiae* исследовали в культуральной жидкости. Для этого образцы для ДСН-ПААГ электрофореза готовили каждые 24 часа из культуральной жидкости.

Как видно из рисунка 4А в течение всего времени инкубации на ДСН-электрофореграмме обнаруживалась мажорная белковая полоса с молекулярной массой 50 кДа. При этом по мере увеличения времени инкубации увеличивалась интенсивность окрашивания этого белка. Таким образом, основным секреторным белком в трансформированных клетках *S. cerevisiae* является 1,4- β -эндоглюканаза гриба *Aspergillus niger*. При этом по мере увеличения времени инкубации количество секретируемого 1,4- β -эндоглюканазы гриба *Aspergillus niger* увеличивается, достигая максимума после 48 часов инкубации. Необходимо отметить в клетках трансформированных плазмидой НО-poly-KanMX4-НО активные белковые зоны не обнаруживались (данные не показаны). Однако молекулярная масса 1,4- β -эндоглюканазы в ДСН-ПААГ превышала расчетную молекулярную массу (37 кДа) фермента. Эти данные указывают на то, что 1,4- β -эндоглюканаза в трансформированных дрожжевых клетках представлена формой с более высокой молекулярной массой. Подобное увеличение молекулярной массы свойственно гликозилированным белкам, так как они часто представлены в виде набора различных по молекулярной массе гликоформ, отличающихся длиной и составом олигосахаридных цепей [13]. Для проверки данного предположения аминокислотную

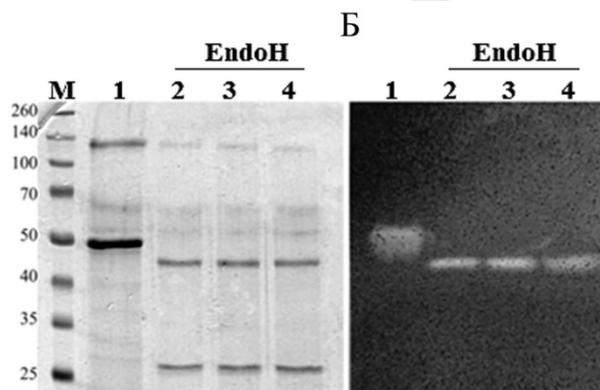
последовательность 1,4-β-эндоглюканазы анализировали на наличие сайтов N-связанного гликозилирования с помощью программы в базе данных NCBI (Рисунок 4А). На основании анализа первичной структуры 1,4-β-эндоглюканазы мы обнаружили четыре потенциальных сайта N-гликозилирования в позициях Asn-38, -100, -212 и 289 (Рисунок 4А).

В последующих экспериментах определяли активность фермента в культуральной жидкости. Активность секретируемой эндо-1,4-β-глюканазы быстро увеличивалась после культивирования в течение 24 часов и достигла максимума после 72 часов (0,78U).

А

```

1  MKFQSTLLLAAGGSALAVPHGPGHKKR↑ASVFEWFGSNESGAEFGTNI PGVWGTDYIFPDPSAISTLIDKGMNFFRVQFM 80
81  MERLLPDSMTGSYDEEYLANLTTVIKAVTDGGANALVDPHNYGRYNGEIIISSTSDFTQTFWENLAGQYKDNDLVMPDTNNE 160
161 YHDMQDLVNLNQAANGIRAAAT SQYIFVEGNSWTGAWTWVDVNDNMKNLTDPEDKI VYEMHQYLDSDGSGTSETCV 240
241 SETIGKERVTEATQWLKDNKKVGFIGEYAGGSNDVCRSAVSGMLEYMANNTDVWKGASWVAAGFWWGDYIIFSLPPDGTA 320
321 YTGMLDILEAYL#
  
```



А – Аминокислотная последовательность эндо-1,4-β-глюканазы; # стоп - кодон, ↑ - предполагаемый сайт отщепления сигнального пептида, потенциальные сайты N-гликозилирования отмечены подчеркиванием; Б – ДСН-ПААГ электрофорез и зимограмма дегликозилированной rENG1. М-маркер массы белка; 1 – секретируемый белок *S. cerevisiae* трансформированной рНО-GAPDH-eng1-KanMX4-НО; 2-4 – секретируемый белок *S. cerevisiae* трансформированной рНО-GAPDH-eng1-KanMX4-НО обработанный Endo H

Рисунок 4 – Дегликозилирование rENG1 с помощью Endo H

После 72 часов культивирования активность фермента медленно снижалась и поддерживалась на уровне 0,7U даже после культивирования в течение 120 часов. Среда культивирования трансформированных с НО-poly-KanMX4-НО плазмидой дрожжей не проявляла эндо-1,4-β-глюканазную активность (Рисунок 5).

Ранее с использованием многокопийной эписомальной плазмиды были экспрессированы несколько различных форм эндо-1,4-β-глюканазы гриба *Aspergillus niger* в *S. cerevisiae* (таблица 2) [15-16]. В нашей работе уровень экспрессии рекомбинантного фермента была намного выше, чем активность ферментов, выявленных в данных работах.

Таблица 2 – Сравнение биохимической характеристики rENG1 с другими грибными ферментами

Эндо-1,4-β-глюканазы	Экспрессирован	Масса белка	Активность Ед/мг	°Т оптимум	рН оптиму	Субстрат	Источник
EglA <i>A.niger</i>	<i>P.pastoris</i>	30кДа	63.83	50	рН 4.0	КМЦ	Quay et al. 2011 [15]
EglA <i>A.niger</i> CBS	<i>K.lactis</i>	30 кДа	59±5	НО	НО	КМЦ	Hasper et al. 2002 [16]
EglB <i>A.niger</i> CBS 120.49	<i>K.lactis</i>	НО	22±4	НО	НО	КМЦ	Hasper et al. 2002 [16]
EglC <i>A.niger</i> CBS 120.49	<i>A.niger</i>	НО	19±1	55	рН 4.5	КМЦ	Hasper et al. 2002 [16]
Eng1 <i>A.niger</i> IFO31125	<i>S.cerevisiae</i>	43 кДа	714	60	рН 6.0	КМЦ	Эта работа

Известно, что системы интеграции генов снижает количество гетерологично экспрессированных белков, однако с практической точки зрения интегральные системы являются более подходящими для стабильности гена и предотвращения потери плазмид рекомбинантными дрожжами.

В ряде работ [17] созданы рекомбинантные штаммы дрожжей коэкспрессирующие целлюлазные гены с помощью дрожжевых векторов для интеграции в трех различных геномных локусах, а именно URA3, LEU2, а HIS3. Соответствующие мутанты широко используются в качестве ауксотрофных маркеров. 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.

В наших экспериментах использован маркерный ген устойчивости к антибиотику G418, что является доминантным и может обеспечивать селекцию трансформантов независимо от генотипа клетки-хозяина. Кроме того, в настоящей работе ген эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger* с целью стабильной экспрессии в дрожжах помещен под контроль хорошо известного конститутивного GAPDH промотора и терминатора.

Хотя в настоящей работе использованы лабораторные штаммы *S. cerevisiae*, описанный подход может быть перспективным для конструирования промышленных штаммов дрожжей эффективно экспрессирующих эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger*.

Литература

- 1 Блинов И.П. Химия микробных полисахаридов. -М., 1984. -162 с.
- 2 Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verrucosum*: дис. ... канд. хим. наук. – МГУ, 2006. – 24 с.
- 3 Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // *Biotechnol. Adv.* -2000. -V.18. -P.355-383.
- 4 Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J. E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // *Current Opinion in Biotechnology.* -2005. -V.16, № 5. –P. 577–583.
- 5 Van Rensburg R., Van Zyl W.H., Pretorius I.S. Engineering yeast for efficient cellulose degradation // *Yeast.* -1998. -V.14. -P.67–76.
- 6 Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo H. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzymes// *Appl. Environ. Microbiol.* -2004. -V.70. –P.1207–1212.
- 7 Voth W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the HO locus // *Nucleic Acids Res.* -2001. –V.29, №12.
- 8 Herskowitz I., Rine J., Strathern J. 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 J.R. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor - NYk, 1992. -P. 583-656.
- 9 Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-β-1,4-β-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast // *J. Biosci. Bioeng.* -2001. -V.92. -P. 434-441.
- 10 Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar//*Anal. Chem.*-1959. -Vol. 31.-P. 426–428.
- 11 Ornstein L., Davis B.J. Disc electrophoresis-I: Background and theory // *Ann. NY. Acad. Sci.* - 1964. - V.121. -P. 321–349.
- 12 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 //*Nature.* - 1970.-V. 227.-P. 680-685.
- 13 Kasturi L., Chen H., Shakin-Eshleman S.H. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors // *Biochem. J.* - 1997. -V. 323. -P.415-419.
- 14 Maley F. et al. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases // *Anal. Biochem.* -1989. -V. 180. -P.195-204.
- 15 Quay D. H. X., Bakar F. D. A., Rabu A., Said M., Illias R. M., Mahadi N. M., Hassan O., and Murad A. M. A. Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, *EglA*, in *Pichia pastoris* // *African Journal of Biotechnology.* - 2011. -V. 10, № 11. - P. 2101-2111.
- 16 Hasper A.A., Dekkers E., van Mil M., van de Vondervoort P.J. I., de Graaff L.H. EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan // *Appl. Environ. Microb.* -2002. -V. 68, № 4.-P.1556-1560.
- 17 Hong J., Wang Y., Kumagai H., Tamaki H. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes // *J. Biotechnol.* -2007. –V.130. – P.114-123.