АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктор философии (PhD)
по специальности 6D070100 - «Биотехнология»
Смекенова Изата Темиргалиевича

Клонирование и оптимизация экспрессии генов целлюлаз в промышленных штаммах *Saccharomyces cerevisiae*

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена созданию с помощью рекомбинантной технологии ДНК и методов клонирования генов рекомбинантных промышленных дрожжевых штаммов, способных эффективно сбраживать целлюлозу в этанол.

Актуальность исследования. На сегодня весь топливный этанол производится биотехнологически — путем сбраживания сахаров (сахарный тростник), или крахмалосодержащего сырья (в основном кукуруза). В условиях угрозы мирового продовольственного кризиса такая стратегия неприемлема, поскольку приводит к еще большему нарастанию дефицита продовольствия и нерациональному использованию сельскохозяйственных угодий. Однако, даже в США, где кукуруза очень дешевая, поддержание рентабельности производства топливного этанола требует государственных субсидий, а для того, чтобы этанол мог составить ценовую конкуренцию нефтепродуктам необходимо дальнейшее существенное снижение цены топливного этанола.

Основными способами удешевления этого продукта могут быть замена сырья для его производства и кардинальное изменение технологии алкогольной ферментации. Замена сырья заключается в том, чтобы вместо зерна злаков для превращения в этанол использовать возобновляемую биомассу целых растений, как травянистых, так и деревьев, включая отходы сельского хозяйства (соломы пшеницы, риса, и др.).

Зерновое хозяйство – главная отрасль земледелия Казахстана. Казахстан является одним из крупнейших стран-производителей зерна в мире. В последние годы общие посевы зерновых культур занимали свыше 80% посевной площади сельскохозяйственных культур. Солома зерновых культур является наиболее важным возобновляемым энергетическим ресурсом в Республике Казахстан. Например, в 1990 году производство соломы составило почти 37 млн. тонн (http://www.kazee.kz). Большая часть соломы зерновых культур сжигается прямо на полях. Сжигание пшеничной соломы приводит к выделению большого количества загрязнителей воздуха, включая твердые частицы (PM10), CO и NO_2. Таким образом, найти альтернативный путь для утилизации излишка соломы пшеницы представляет большой интерес и важную необходимость.

Изменение технологии алкогольной ферментации подразумевает применение технологии консолидированного биопроцесса гидролиза и сбраживания (CBP), т.е. прямой ферментации целлюлозосодержащего субстрата в этанол. Идеальным решением данного вопроса было бы использование микроорганизмов, способных одновременно гидролизовать биомассу и ферментировать образующиеся сахара в этанол. Однако таких микроорганизмов,

обладающих всеми вышеуказанными свойствами, не существует в природе.

Целлюлоза является наиболее распространенным биологическим полимером, представляющий собой линейный полимер, у которого неразветвлённые цепочки из остатков β-глюкозы связаны β-1,4-глюкозидными связями. Гидролиз целлюлозы с образованием растворимых сахаров осуществляется комбинацией трех основных типов целлюлаз: (I) эндо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.4), расщепляющей внутренние β-1,4-гликозидные связи; (II) экзо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.91), отщепляющие целлобиозу с концов полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы; (III) 1,4-β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21), расщепляющей целлобиозу до глюкозы. Эти ферменты известны как целлюлазы, которые проявляют синергизм для полного гидролиза целлюлозы до растворимых олигомерных и мономерных сахаров. Ключевыми ферментами целлюлазного комплекса, ответственными за глубокий гидролиз кристаллической целлюлозы, являются экзо-1,4-β-глюканазы или целлобиогидролазы, основным продуктом действия которых является целлобиоза. Большинство из них относятся к семейству 6 и 7 гликозил-гидролаз. В настоящее время, большинство коммерческих целлюлазных препаратов производится с помощью грибов рода *Trichoderma* и/или *Aspergillus*.

На сегодняшний день наиболее широко используемым организмом в процессах производства этанола являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Применение дрожжей *S. cerevisiae*, также известных как «пекарские дрожжи», для приготовления этанола из гексозных сахаров уходит корнями в доисторические времена. Было рассмотрено несколько микроорганизмов для производства этанола из лигноцеллюлозы, включая как бактерии, так и дрожжи. Дрожжи *S. cerevisiae* оказались более надежными, чем бактерии, относительно толерантности к конечному продукту этанолу и другим соединениям, присутствующих в гидролизатах. Кроме этого, дрожжи *S. cerevisiae* входят в список организмов «Безопасные в обращении» (GRAS, generally recognized as safe). Однако, природные дрожжи *S. cerevisiae* не содержат гены 1,4-β-гликозил-гидролаз (целлюлаз), следовательно, они не способны ферментировать целлюлозу, содержащуюся в клеточных стенках растений. Но из-за высокой способности сбраживать глюкозу до этанола и выдерживать высокое содержание этанола в среде, дрожжи *S. cerevisiae* являются самым подходящим кандидатом для биоконверсии целлюлозосодержащей биомассы в биотопливо. В последние годы усилия в области генной инженерии, связанные с созданием дрожжей, в частности, *S. cerevisiae* способных сбраживать целлюлозу, сосредоточились на клонировании генов, кодирующих целлюлазы. В связи с этим грибные целлюлазные гены были клонированы и экспрессированы в штаммах *S. cerevisiae*. Кроме этого, был создан рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* коэкспрессирующий три целлюлитических фермента (экзо-1,4-β-глюканазы, эндо-1,4-β-глюканазы и 1,4-β-глюкозидазы) и способный конвертировать аморфную целлюлозу в этанол. Однако, во всех вышеперечисленных работах в качестве экспрессирующих векторов использовались эписомальные, или плазмидные вектора. Известно, что трансформированные с многокопийными автономными YEp векторами клетки дрожжей содержат до 40 копий плазмид на

клетку. Непрерывная экспрессия большого количества чужеродных генов в *S. cerevisiae*, может привести к истощению энергетических ресурсов и нарушению метаболизма клетки. Кроме этого, данный тип плазмид обычно трудно стабильно поддерживать в клетках и, как правило, они с относительно высокой частотой утрачиваются клетками, особенно при отсутствии селективного давления по маркерам плазмид. С практической точки зрения для стабильности белка, а также для предотвращения потери рекомбинантного гена в отсутствие селективного фактора, более подходящим является использование интегральных векторов, обеспечивающих внедрение генов в хромосому дрожжей.

Yamada с соавторами использовали длинные концевые повторы *Ty* элементов, известных как δ-последовательности, которые являются хорошими мишенями для интеграции генов путем гомологичной рекомбинации, так как по всему геному дрожжей содержится приблизительно 425 копий данной последовательности. В связи с этим δ-интеграционные векторы были использованы для стабильного повышения числа копий гена-мишени в *S. cerevisiae*. Векторы для δ-интеграции были использованы для экспрессии человеческого фактора роста, антикоагулянта-гирудина, глюкоамилазы. Однако все вышеперечисленные интеграционные векторы, содержали 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. Большая часть этих работ проведена с помощью лабораторных штаммов дрожжей в связи с легкостью генетической манипуляции, но в отличие от промышленных штаммов, они не были селектированы для крупномасштабного производства этанола.

Промышленные штаммы имеют несколько более выраженные признаки, необходимые для производства этанола, такие как высокий темп роста, ферментации и наработки этанола, а также устойчивость к высоким концентрациям этанола и высокой температуре. Тем не менее, во время гидролиза биомассы лигноцеллюлозный материал часто разлагается до ингибирующих рост соединений, таких как 2-фуральдегид (фурфурол), слабые кислоты и фенольные соединения. Эти ингибиторы токсичны для микробного метаболизма и замедляют ферментацию. Несколько исследований были посвящены селекции промышленных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, устойчивых к ингибирующим соединениям и способных к ферментации лигноцеллюлозных сахаров. Однако, устойчивость к ингибирующим соединениям может варьироваться в широких пределах в зависимости от штаммов дрожжей. Следовательно, для превращения полученных из биомассы сахаров в этанол важно выбрать штаммы дрожжей с промышленным фоном и высокой устойчивостью к ингибиторам. Эти природно-устойчивые штаммы могут служить платформой для конструирования рекомбинантных штаммов, способных использовать целлюлозу в качестве источника углерода для производства этанола.

В связи с этим создание новых рекомбинантных промышленных штаммов микроорганизмов, продуцентов целлюлаз устойчивых к действию стрессовых факторов, а также изучение свойств целлюлолитических и сопутствующих им белков, является задачей, имеющей большое научное и практическое значение.

Цель исследования. Создание рекомбинантных промышленных штаммов дрожжей, содержащих введенные гены, кодирующие экзо-1,4-β-глюканазы, эндо-1,4-β-глюканазу, 1,4-β-глюкозидазу и мембранный переносчик целлодекстринов, для эффективного сбраживания целлюлозы в этанол.

Задачи исследования:

1. Сравнительный анализ экспрессии гена эндо-1,4-β-глюканазы гриба *Aspergillius niger* в разных экспрессионных векторных системах;
2. Создание промышленных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* с геном β-глюкозидазы гриба *Thermoascus aurantiacus* и оценка их способности сбраживать целлобиозу в этанол;
3. Анализ характера гликозилирования TaBGL1, синтезированного различными рекомбинантными штаммами *S. cerevisiae*;
4. Оценка устойчивости рекомбинантных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* к индивидуальным стрессовым факторам;
5. Создание промышленного штамма дрожжей *S. cerevisiae*, коэкспрессирующего β-глюкозидазу гриба *T. aurantiacus* и мембранный переносчик целлодекстринов гриба *Neurospora crassa*, а также анализ его способности расти и производить этанол в жидкой среде с целлобиозой;
6. Создание промышленного штамма *S. cerevisiae*, стабильно коэкспрессирующего гены β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus*, экзо-1,4-β-глюканаз гриба *Lentinula edodes* и эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger*;
7. Исследование способности сконструированного промышленного штамма *S. cerevisiae* сбраживать целлюлозу в этанол в анаэробных условиях.

Объект исследования. Промышленные штаммы дрожжей. Штамм ATCC 24860 был получен из Американской коллекции типовых культур (ATCC), штаммы YB-2625, Y-1528 и Y-2034 были получены из коллекции культур ARS в Национальном центре исследования по использованию сельскохозяйственных культур, Пеория, Иллинойс. Выбранные штаммы *S. cerevisiae* широко используются для производства топливного и питьевого этанола на основе крахмалосодержащего сырья, и обладают важными признаками необходимыми для промышленного использования. Штамм дрожжей Y-1528 ранее рекомендовался для ферментации гидролизатов хвойных пород из-за редкой способности дрожжей ко-ферментировать глюкозу и галактозу. Штамм дрожжей Y-2034 может сбраживать различные сахара, обычно присутствующие в различных видах сырья пищевых отходов и в процессах ферментации этанола. Штаммы ATCC 24860 и YB-2625 считаются наиболее эффективными ферментерами ксилулозы.

Предмет исследования. Клонирование и экспрессия генов целлюлаз в промышленных штаммах дрожжей.

Методы исследования. В работе использованы методы молекулярного клонирования, микробиологии и биохимии с некоторыми модификациями,

указанными в тексте работы.

Научная новизна исследования

Сконструирован интегральный вектор для интеграции в *HO* локус дрожжей, содержащий ген 1,4-β-глюкозидазы (*tabgl1*) гриба *T. aurantiacus* с сигнальным пептидом α-фактора дрожжей под контролем конститутивного GAPDH промотора и терминатора, и ген устойчивости к генетицину (G418). Впервые созданы четыре промышленные рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* для ферментации целлобиозы после стабильной интеграции гена *tabgl1*, кодирующего β-глюкозидазу из *Thermoascus aurantiacus* (TaBGL1). Полученные рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* секретируют TaBGL1, который может гидролизовать целлобиозу до гюкозы с последующей ее ферментацией в этанол. Установлено, что степень гликозилирования секретируемого TaBGL1 зависит от используемых штаммов дрожжей и в значительной степени зависит от источников углерода (целлобиоза или глюкоза). Рекомбинантные штаммы дрожжей показали высокую осмотолерантность и устойчивость к различным концентрациям этанола, фурфурола и H_2O_2, а также к высоким температурам.

Сконструирован интегральный вектор для интеграции в *HO* локус дрожжей, содержащий ген 1,4-β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus* без сигнального пептида α-фактора дрожжей и ген мембранного переносчика целлодекстринов (*cdt1*) гриба *N. crassa* с зеленым флуоресцентным белком (eGFP) под сильными конститутивными TEF1 и PGK1 промоторами, и ген устойчивости к генетицину (G418). Показана способность рекомбинантного штамма расти в среде с целлобиозой в качестве единственного источника углеводородов. Полученные рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* способны конвертировать целлобиозу в этанол за счет интегрированных в хромосому генов *cdt1* и *tabgl1*.

Сконструирован интегральный вектор для интеграции в δ-последовательности генома дрожжей, несущий ген эндо-1,4-β-глюконазы гриба *A. niger* и два гена экзо-1,4-β-глюканазы гриба *L.edodes* (*cel7A* и *cel6B*) с доминантным маркерным геном устойчивости к флеомицину (*sh ble*).

Впервые создан новый стабильный штамм дрожжей с генами целлюлитических ферментов интегрированными в хромосомы дрожжей. Данный штамм обеспечивает непрерывную экспрессию генов целлюлитических ферментов и секрецию продуктов экспрессии в окружающую среду. Установлено, что рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, экспрессирующий гены целлюлаз, способен расти в синтетической среде, содержащий авицел или карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) в качестве единственного источника углерода. Рекомбинантный штамм производил 5,62 г/л этанола (22% от теоретического максимального выхода) при использовании 5% авицела в качестве субстрата, тогда как из 5% предобработанной соломы пшеницы производил 1.43 г/л этанола (14% от теоретического максимального выхода).

Теоретическое и практическое значение работы. Характеристика и оптимизация экспрессии генов термостабильных целлюлолитических грибов в дрожжевых системах имеют огромное теоретическое значение для понимания закономерностей регуляции экспрессии генов. Практическая значимость работы обусловлена перспективами использования рекомбинантных штаммов дрожжей

– носителей целлюлазных генов, для производства этанола из возобновляемых и дешевых источников целлюлозы (соломы злаков, отходов бумажной промышленности, опилок и других).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Экспрессия эндо-1,4-β-глюканазы *A. niger* в эписомальном плазмидном векторе YEGAp значительно замедляет рост культуры дрожжевых клеток. Стабильная экспрессия гена этого фермента в *HO* локусе хромосомы дрожжей не вызывает подавление роста, и активность секретированного фермента стабильно сохраняется на протяжении всего времени инкубации (880 ед.).

- Рекомбинантные штаммы, экспрессирующие TaBGL1, хорошо растут на среде с целлобиозой и потребляют весь доступный сахар. Выход этанола из целлобиозы в среднем составляет 7.6 г/л (77% от теоретического максимума).

- Эффективность секреции и характер гликозилирования TaBGL1 зависит от генетического фона исходного штамма дрожжей и от источника углерода, присутствующего в среде культивирования.

- Созданные рекомбинантные штаммы продемонстрировали промышленно значимые характеристики, такие как интенсивность роста, устойчивость к высоким температурам, высокая секреторная активность, высокая устойчивость к этанолу и высокая устойчивость к воздействию ингибирующих соединений, обычно встречающиеся в гидролизатах лигноцеллюлозы.

- Рекомбинантный штамм Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp*, созданный путем интеграции внутриклеточных путей ферментации целлобиозы, эффективно экпрессирует гены мембранного переносчика целлодекстринов *cdt1* и *tabgl1* под контролем конститутивных промоторов TEF1 и PGK1, соответственно.

- Рекомбинантный штамм Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* хорошо растет на среде с целлобиозой и производит этанол в количестве 5.55 г/л из 2% целлобиозы, что составляет 52% от теоретического максимума.

- Сконструирован интегральный вектор на основе δ-последовательности, содержащий ген эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger* и два гена экзо-1,4-β-глюканазы гриба *L. edodes* с доминантным маркерным геном устойчивости к флеомицину.

- Создан промышленный рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, коэкспрессирующий гены 1,4-β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus*, эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger* и экзо-1,4-β-глюканаз гриба *L. edodes*.

- Показана возможность прямой конверсии лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол с использованием рекомбинантного штамма дрожжей Y-2034-TaBgl1/*eng1•cel6B•cel7A*, который производит 5,62 г/л этанола из 5% авицела и 1,43 г/л из 5% предобработанной соломы пшеницы за 3 суток.

Основные результаты исследований и выводы:

1.Экспрессия эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger* (ENG1) в эписомальном плазмидном векторе YEGAp значительно замедляла рост культуры дрожжевых клеток. При этом, стабильная экспрессия гена этого фермента в *HO* локусе хромосомы дрожжей не вызывала подавления роста, и активность секретированного фермента стабильно сохранялась на протяжении всего времени инкубации (880 ед./мг).

2. ENG1, экспрессированный на основе p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* интегративного вектора, в дополнение к его N-гликозилированию, содержал остатки сахаров на O-сайте гликозилирования. Тогда как ENG1 экспрессированный эписомальной плазмидой присутствовал в рекомбинантных дрожжах только в N-гликозилированной форме. Высказано предположение, что O-гликозилированная форма ENG1 сохраняет более стабильную активность при непрерывном культивировании рекомбинантного дрожжевого штамма с интегральным вектором, чем только N-гликозилированная форма, секретируемая штаммом с эписомальным вектором.

3. Показано, что ENG1 обладал оптимальной каталитической активностью при pH 6,0 и был стабилен в диапазоне значений pH 5,0-9,0. Оптимальная температура фермента для каталитической активности при pH 6,0 составляла 70°C. Более 95% от исходной активности фермента сохранялось после инкубации фермента при 60°C в течение 2 часов.

4. Сконструирован интегральный вектор для интеграции в *HO* локус дрожжей, содержащий ген 1,4-β-глюкозидазы гриба *T. Aurantiacus* (*tabgl1*) с сигнальным пептидом α-фактора дрожжей под контролем конститутивного GAPDH промотора и терминатора, и геном устойчивости к генетицину (G418).

5. Впервые созданы четыре промышленные рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* для ферментации целлобиозы после стабильной интеграции гена *tabgl1*. Полученные рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* секретировали 1,4-β-глюкозидазу (TaBGL1) гриба *T. aurantiacus*, которая может гидролизовать целлобиозу до глюкозы с последующей ферментацией в этанол. Показано, что рекомбинантные штаммы производили в среднем 7,6 г/л этанола (77% от теоретического максимального выхода) при использовании целлобиозы в качестве единственного источника углеводорода.

6. Показано, что гликозилирование секретируемого TaBGL1 зависит от генетического фона штаммов дрожжей и в значительной степени от источников углерода присутствующих в среде культивирования (глюкоза или целлобиоза). Различия в характере N-гликозилирования TaBGL1 приводит к изменению удельной активности ферментов, при этом не оказывая значительного влияния на биохимические свойства, такие как термостабильность, pH-стабильность, температурный и pH-оптимумы активности.

7. Показано, что созданные рекомбинантные штаммы проявляют высокую осмотолерантность и устойчивость к различным концентрациям этанола, фурфурола и H_2O_2, а также к высоким температурам.

8. Сконструирован интегральный вектор для интеграции в *HO* локус дрожжей, содержащий ген (*tabgl1*) без сигнального пептида α-фактора дрожжей и гибридный ген мембранного переносчика целлодекстринов (*cdt1*) гриба *N. crassa* слитый с геном зеленого флуоресцентного белка под сильными конститутивными TEF1 и PGK1 промоторами, а также ген устойчивости к генетицину (G418).

9. Впервые создан рекомбинантный штамм Y-2034/*tabgl1*•*cdt1-egfp* эффективно экпрессирующий гены мембранного транспортера целлодекстринов *cdt1* и *tabgl1* под контролем конститутивных промоторов

TEF1 и PGK1, соответственно. Показано, что рекомбинантный штамм Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* хорошо рос на среде с целлобиозой и производил этанол в количестве 5.55 г/л из 2% целлобиозы, что составляет 52% от теоретического максимума.

10. Сконструирован интегральный вектор на основе δ-последовательности, содержащей гены эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger* и два гена экзо-1,4-β-глюканазы гриба *L. edodes* с доминантным маркерным геном устойчивости к флеомицину.

11. Впервые создан промышленный рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, коэкспрессирующий гены 1,4-β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus*, эндо-1,4-β-глюканазу гриба *A. niger* и экзо-1,4-β-глюконаз гриба *L. edodes*.

12. Показана возможность прямой конверсии лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол в анаэробных условиях с использованием рекомбинантного штамма дрожжей Y-2034-TaBgl1/*eng1•cel6B•cel7A*. Данный штамм наиболее эффективно конвертировал авицел в этанол, концентрация этанола при этом достигала 5,62 г/л за 3 суток. При конверсии предобработанной соломой пшеницы были достигнуты концентрации спирта 1,43 г/л.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках научных проектов 0144/ГФ «Создание рекомбинантных штаммов микроорганизмов, эффективно экспрессирующие гены целлюлаз для получения биотоплива из целлюлозсодержащего сырья» и 1324/ГФ «Разработка технологии получения биоэтанола из целлюлозного сырья с помощью генетически модифицированных промышленных штаммов дрожжей» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены:

- на международных научных конференциях студентов и молодых учёных «Фараби әлемі», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, 2016-2019 гг.;
- на международной научно-практической конференций «Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоиндустрию», (2016 г., Алматы, Казахстан);
- на международной конференции «European *Biotechnology Congress*» (2017 г., Дубровник, Хорватия).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 22 печатных работах, в том числе 2 статьи и 2 тезиса в журналах с ненулевым импакт-фактором входящим в базу данных Web of Science или Scopus, 6 статей в республиканских научных изданиях, рекомендуемых ККСОН МОН РК, и 12 тезисов в материалах международных конференций. На основании результатов диссертационной работы был получен 1 патент РК на полезную модель №2017/0230.2 «Интегративный плазмидный вектор для экспрессии генов в дрожжах».

Структура диссертации. Диссертация изложена на 145 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников литературы из 260 наименований из них 248 на английском языке; содержит 10 таблиц, 55 рисунков и 1 приложение.