**Смекенов Изат Темиргалиевичтың**
6D070100-«Биотехнология» мамандығы бойынша
фиолософия докторы дәрежесін (PhD) алуы диссертациясына
**АҢДАТПА**

# Целлюлаза гендерін *Saccharomyces cerevisiae* өндірістік штамдарында клондау және экспрессиясын оптимизациялау

**Жұмыстың жалпы сипаттамасы**. Диссертациялық жұмыс рекомбинантты ДНҚ технологиясын және гендерді клондау әдістерін қолдана отырып, целлюлозаны этанолға ашытуға қабілетті рекомбинантты өнеркәсіптік ашытқы штамдарын алуға арналған.

**Зерттеудің өзектілігі.** Бүгінгі таңда барлық отындық этанол биотехнологиялық жолмен – қанттарды (қант құрағы) немесе крахмал құрамдас шикізатты (негізінен жүгері) ашыту арқылы шығарылады. Әлемдік азық-түліктік дағдарысы қауіпінде бұл стратегия тиімді емес, себебі ол азық-түлік тапшылығының одан әрі артуына және ауылшаруашылық алқаптарын мақсатсыз пайдалануға алып келеді. Дегенмен, жүгері бағасы өте арзан АҚШ-тың өзінде отын этанолы өндірісінің рентабельділігін сақтау мемлекеттік субсидияларды талап етеді, ал этанол мұнай өнімдерімен баға бәсекелестігін құрауы үшін отын этанолының бағасын одан әрі төмендету қажет.

Бұл өнімнің өзіндік құнын төмендетудің негізгі жолдары – өндіріс шикізатын ауыстыру және алкогольді ферментациялау технологиясын түбегейлі өзгерту болып табылады. Шикізатты алмастыру дегеніміз – этанол ашытуда қолданылатын дәнді дақылдардың орнына бүтін өсімдіктердің жаңартылатын биомассасын: шөптесін өсімдіктер мен ағаштарды, соның ішінде ауылшаруашылық қалдықтарын (бидай сабаны, күріш және т.б.) пайдалану.

Астық шаруашылығы – Қазақстанның егін шаруашылығының басты саласы. Қазақстан әлемдегі ең ірі астық өндіруші елдердің бірі болып табылады. Соңғы жылдары дәнді дақылдардың жалпы егістіктері ауыл шаруашылық дақылдарының егіс алқабының 80% - дан астам үлесін құрады. Дәнді дақылдардың сабаны Қазақстан Республикасында ең маңызды жаңартылатын энергетикалық ресурсы болып табылады. Мысалы, 1990 жылы сабан өндірісі шамамен 37 млн. тоннаны құрады (http://www.kazee.kz). Дәнді дақылдар сабанының басым бөлігі егістік алқаптарында тікелей өртеледі. Бидай сабанын жағу ауаны ластаушылардың, соның ішінде қатты бөлшектер (PM10) мен CO және $NO_2$ көп мөлшерде бөлінуіне әкеледі. Осыған орай, бидайдың артық сабанын кәдеге жаратудың баламалы жолын табу үлкен қызығушылықты және маңызды қажеттілікті тудырады.

Алкогольді ферментация технологиясын өзгерту гидролиз бен ашытудың (СВР) шоғырландырылған биопроцесс технологиясын пайдаланумен түсіндіріледі, яғни құрамында целлюлоза бар субстратты этанолға тікелей ферментациялау. Бұл мәселенің тамаша шешімі, биомассаны гидролиздейтін және алынған қантты этанолға ашытуға қабілетті микроорганизмдерді

пайдалану болып табылады. Алайда, жоғарыда аталған барлық қасиеттерге ие мұндай микроорганизмдер табиғатта жоқ.

Целлюлоза - ең көп таралған биологиялық полимер, ол β-глюкоза қалдықтарының тармақталмаған тізбегі β-1,4-глюкозидті байланысымен байланысқан сызықты полимер болып табылады. Ерігіш қант түзілуіне алып келетін целлюлозаның гидролизі целлюлазаның үш негізгі түрінің бірігуімен жүзеге асырылады: (I) эндо-1,4-β-глюканаза (ЕС 3.2.1.4), олар ішкі β-1,4-гликозидті байланыстарды бұзады; (II) экзо-1,4-β-глюканазалар (ЕС 3.2.1.91), табиғи немесе ішінара гидролизденген целлюлоза полимеінің соңдарынан целлобиозаны бөледі; (III) 1,4-β-глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21), ол целлобиозаны глюкозаға дейін ыдыратады. Бұл ферменттер целлюлаза ретінде белгілі және целлюлозаның еритін олигомерлі және мономерлі қанттарға дейін толық гидролиздеуде синергизмді әсер етеді. Кристаллды целлюлозаның терең гидролизіне жауап беретін целлюлаза кешенінің негізгі ферменттері - әсер етуінің негізгі өнімі целлобиоза болып табылатын экзо-1,4-β-глюканазалар немесе целлобиогидролазалар. Олардың көпшілігі 6 және 7 гликозил-гидролазалар тобына жатады. Қазіргі уақытта коммерциялық целлюлоза препараттарының көпшілігі *Trichoderma* және/немесе *Aspergillus* саңырауқұлақтарымен өндіріледі.

Қазіргі таңда этанол өндірісінде ең көп қолданылатын организм *Saccharomyces cerevisiae* ашытқысы болып табылады. *S. cerevisiae* ашытқысын, сондай-ақ «наубайхананың ашытқысы» деп те атайды, гексозды қанттардан этанолды дайындау тарихқа дейінгі дәуірлерде қалыптасқан. Лигноцеллюлозадан этанол өндіру үшін бірнеше микроорганизмдер қарастырылды, оның ішінде бактериялар да, ашытқы да бар. *S. cerevisiae* ашытқылары гидролизат құрамындағы соңғы өнім этанолға және басқа да қосылыстарға толеранттылығы нәтижесінде бактерияларға қарағанда тұрақтылық көрсетеді. Сонымен қатар, *S. cerevisiae* ашытқысы «Қауіпсіз» (GRAS, қауіпсіз деп танылған) ағзалар тізіміне енгізілген. Алайда табиғи ашытқы *S. cerevisiae* құрамында 1,4-β-гликозил- гидролаза (целлюлаза) гендері болмайды, сондықтан олар өсімдік жасушаларының қабырғаларында орналасқан целлюлозаны ашытуға қабілеттілігі жоқ. Бірақ глюкозаны этанолға дейін ашытудың жоғарғы көрсеткіші мен ортада этанолдың жоғары құрамына төзімділігі үшін *S. cerevisiae* ашытқысы целлюлоза бар биомассаны биоотынға айналдыруға ең қолайлы кандидат болып табылады. Соңғы жылдары гендік инженерия саласында барлық күш жігер целлюлозаны ашытуға қабілетті ашытқыларды құрастыруға жұмсалуда, атап айтқанда *S. cerevisiae* клеткасында целлюлазаны кодтайтын гендерді клондауға назар аударылуда. Осыған байланысты саңырауқұлақтың целлюлоза гендері *S. cerevisiae* штамдарында клондалып, экспрессияланды. Сонымен қатар үш целлюлитикалық ферменттерді коэкспрессиялайтын (экзо-1,4-β-глюканаза, эндо-1,4-β-глюканаза және 1,4-β-глюкозидаза) және аморфты целлюлозаны этанолға айналдыратын *S. cerevisiae* ның рекомбинантты штаммы жасалды. Алайда, жоғарыда аталған барлық жұмыстарда экспрессиялаушы вектор ретінде эписомальды немесе плазмидалық векторлар қолданылды. Көпкөшірмелі автономды YEp векторымен

трансформацияланған ашытқы жасушаларында бір жасушаға 40-қа дейін плазмида көшірмесі болатыны белгілі. *S. cerevisiae*-да көптеген бөтен гендердің үздіксіз экспрессиясы энергия ресурстарының сарқылуына және клеткалық зат алмасуының бұзылуына әкелуі мүмкін. Сонымен қатар, плазмиданың бұл түрін жасушаларда тұрақты ұстап тұру қиынға соғады. Әдетте олар жасушалармен салыстырмалы түрде жоғары жиілікте жоғалтылады, әсіресе плазмиданың маркерлері бойынша селективті қысым болмаған жағдайда. Практикалық тұрғыдан ақуыздың тұрақтылығы үшін, сондай-ақ селективті фактор болмаған кезде рекомбинантты геннің жоғалуын болдырмау үшін ашытқы хромосомасына гендердің енуін қамтамасыз ететін интегралды векторларды қолданған тиімді болады.

Yamada соавторларымен өз іжұмыстарында, гомологиялық рекомбинация жолымен гендердің интеграциясы үшін қолайлы нысана болып табылатын, δ-тізбегі ретінде белгілі *Ty* элементтерінің ұзын қайталанатын соңдарын қолданды. Ашытқылардың бүкіл геномы бойынша осы тізбектің шамамен 425 көшірмесі бар. Осыған байланысты δ-интегралдық векторлар *S. cerevisiae* клеткасында нысана геннің көшірмелер санын тұрақты көбейту үшін пайдаланылды. δ – интеграциялау векторлары адамның өсу факторын, гирудин-антикоагулянты, глюкоамилаза экспрессиясы үшін қолданылды. Алайда, жоғарыда аталған барлық дерлік интеграциялық векторлардың құрамында LEU2-D, HIS3, TRP1 және URA3 сияқты ауксотрофты маркерлерлік гендері болды. Аталған амалдар жақсы сипатталған мутантты ашытқы штамдарының тар шеңберімен жұмыс істеуге мәжбүр етеді. Мұндай ашытқы штамдары өндірісте қолдануға жарамсыз, өйткені өнеркәсіптік ашытқы штамдарында ішкі генетикалық маркерлер жоқ, мысалы аминқышқылдары немесе нуклеин қышқылдарына қажеттілігі және т.б. Бұл жұмыстың көп бөлігі генетикалық манипуляциялардың жеңілділігі үшін ашытқылардың лабораториялық штамдарымен жүргізілді, бірақ өндірістік штамдармен салыстырғанда, олар кең көлемде этанол өндіруге арналмаған.

Өнеркәсіптік штамдар этанолды өндіру үшін бірнеше айырықша белгілерге ие, мысалы жоғары өсу қарқыны, этанол ферментациясы мен өндірісі, сонымен қатар этанолдың жоғары концентрациясы мен жоғары температураға төзімділігі. Алайда, биомассаның гидролизі кезінде лигноцеллюлозды материал көбінесе 2-фуральдегид (фурфурол), әлсіз қышқылдар және фенолды қосылыстар сияқты өсу ингибиторларына дейін ыдырайды. Бұл ингибиторлар микробтардың метаболизмі үшін улы болып табылады және ферментацияны тежейді. Бірнеше зерттеулер *S. cerevisiae* ашытқысының ингибиторлық қосылыстарға төзімді және лигноцеллюлозды қантты ашытуға қабілетті штамдарын іріктеуге арналған. Алайда ингибиторлық қосылыстарға төзімділік ашытқылардың штамдарына байланысты әртүрлі болуы мүмкін. Сондықтан, биомассадан алынған қанттарды этанолға айналдыру үшін өнеркәсіптік фонды және ингибиторларға жоғары төзімділікке ие ашытқы штамдарын таңдау керек. Бұл табиғи-төзімді штамдар этанол өндірісі үшін целлюлозаны көміртек көзі ретінде қолдануға қабілетті рекомбинантты штамдардың құрылысына арналған алаң бола алады.

Осыған байланысты стресс факторларына төзімді целлюлазалар өндіруге қабілетті микроорганизмдердің жаңа рекомбинантты өндірістік штамдарын құрастыру, сондай-ақ целлюлитикалық және оларға ілеспе ақуыздардың қасиеттерін зерттеу үлкен ғылыми және практикалық маңыздылыққа ие болып табылады.

**Зерттеу жұмысының мақсаты.** Целлюлозаны этанолға тиімді ферменттеу мақсатында экзо-1,4-β-глюканаза, эндо-1,4-β-глюканаза, 1,4-β-глюкозидаза және целлодекстриндердің мембраналық тасмалдаушы белоктарын кодтайтын гендері бар рекомбинантты өнеркәсіптік ашытқы штамдарын құрастыру.

**Зерттеу жұмысының міндеттері:**

1. Әр түрлі экспрессиялық векторлық жүйелерде *Aspergillius niger* саңырауқұлағының эндо-1,4-β-глюканазасының гендік экспрессиясын салыстырмалы талдау;

2. *Thermoascus aurantiacus* саңырауқұлағының β-глюкозидаза гені бар *S. cerevisiae* ашытқысының өнеркәсіптік штамдарын құру және олардың целлобиозаны этанолға ашыту қабілеттілігін бағалау;

3. Әртүрлі рекомбинантты *S. cerevisiae* штамдарымен синтезделген TaBGL1 белогының гликозилдену сипатын талдау;

4. *S. cerevisiae* ашытқысының рекомбинантты штамдарының жеке стресс факторларына тұрақтылығын бағалау;

5. *T. aurantiacus* саңырауқұлағының β-глюкозидазасын және *Neurospora crassa* саңырауқұлағының мембраналық целлодекстриндер тасымалдаушысын коэкспрессиялайтын *S. cerevisiae* ашытқысының өндірістік штамдарын құрастыру , сонымен қатар целлобиоза қосылған сұйық ортада өсу және этанол өндіру қабілеттілігін талдау;

6. *T. aurantiacus* саңырауқұлағының β-глюкозидаза, *Lentinula edodes* саңырауқұлағының экзо-1,4-β-глюканаза және *A. niger* саңырауқұлағының эндо-1,4-β-глюканаза гендерін коэкспрессиялайтын *S. cerevisiae* өндірістік штаммын құрастыру;

7. Құрастырылған *S. cerevisiae* өнеркәсіптік штаммының анаэробты жағдайда целлюлозаны этанолға ашыту қабілетін зерттеу.

**Зерттеу объектісі.** Зерттеу барысында ашытқылардың өнеркәсіптік штамдары қолданылды. ATCC 24860 штаммы Американдық типтік культура (ATCC) коллекциясынан алынды, YB-2625, Y-1528 және Y-2034 штамдары Пеория, Иллинойс штатындағы ауылшаруашылық культураларды пайдалану Ұлттық зерттеу орталығындағы ARS культуралар коллекциясынан алынды. Таңдалған *S. cerevisiae* штамдары құрамында крахмал бар шикізат негізінде жанармай мен этанол өндірісі үшін кеңінен қолданылады және өнеркәсіпте қолдану үшін маңызды белгілерге ие. Ашытқының Y-1528 штаммы қылқан жапырақтылардың гидролизаттарын ферментациялау үшін ұсынылған, себебі ашытқының глюкоза мен галактозаны ферменттейтін сирек қабілеті бар. Y-2034 ашытқы штаммы әртүрлі шикізат көздерінде, тамақ қалдықтарында және этанолдың ферментациялау процестерінде кездесетін әртүрлі қанттарды ашытуға қабілетті. ATCC 24860 және YB-2625 штамдары ксилулозалардың ең тиімді ферментёрі болып саналады.

**Зерттеу пәні.** Ашытқы штамдарында целлюлоза гендерін клондау және экспрессиялау.

**Зерттеу әдістері.** Зерттеу барысында жұмыс мәтінінде көрсетілген кейбір өзгертулермен толықтырылған молекулалық клондау әдістері, микробиология және биохимия әдістері қолданылды.

**Зерттеудің ғылыми жаңалығы**

Ашытқылардың *HO* локусына интеграциялау үшін, конститутивті GAPDH промоторы мен терминаторының бақылауында клондалған ашытқының α-фактор сигналдық пептиді жалғанған *T. aurantiacus* саңырауқұлағының 1,4-β-глюкозидаза гені (*tabgl1*) және генетицинге төзімділік гені (G418) бар интегралды вектор құрастырылды. Алғаш рет *Thermoascus aurantiacus* (TaBGL1) β-глюкозидазасын кодтайтын *tabgl1* генінің тұрақты интеграциялауы арқылы целлобиозаны ферменттеуге қабілетті төрт өнеркәсіптік рекомбинантты *S.cerevisiae* штамдары құрастырылды. Алынған *S. cerevisiae* рекомбинантты штамдары целлобиозаны глюкозаға дейін гидролиздеуге қабілетті TaBGL1 ферментін секреттейді, және де глюкозаны этанолға ферментациялайды. Түзілген TaBGL1-дің гликозилдену дәрежесі пайдаланылған ашытқы штамдарына және негізінен қолданылған көміртек көздеріне (целлобиоза немесе глюкоза) байланысты екендігі анықталды. Рекомбинантты ашытқы штамдары жоғары осмотолеранттылықты және этанол, фурфурол және $H_2O_2$ әртүрлі концентрацияларына, сондай-ақ жоғары температураға төзімділігін көрсетті.

Ашытқылардың *HO* локусына интеграциялау үшін, ашытқының α-факторлық сигналдық пептиді қосылмаған *T. aurantiacus* саңырауқұлағының 1,4-β-глюкозидаза гені (*tabgl1)* және күшті конститутивті TEF1 және PGK1 промоторының бақылауындағы жасыл флуоресцентті белогы (eGFP) бар *N. crassa* саңырауқұлағының целлодекстриндердің мембраналық тасмалдаушы гені (*cdt1*) және генетицинге төзімділік гені (G418) бар интегралды вектор құрастырылды. Рекомбинантты штаммның көмірсутектердің жалғыз көзі ретінде целлобиоза қосылған ортада өсу қабілеті көрсетілді. Алынған *S. cerevisiae* рекомбинантты штамдары хромосомаға интеграцияланған *cdt1* және *tabgl1* гендерінің әсерінен целлобиозаны этанолға айналдыра алады.

Ашытқы геномының δ-тізбегіне интеграциялау үшін *A. niger* саңырауқұлақтарының эндо-1,4-β-глюконаза генін және флеомицинге (*sh ble*) төзімді доминантты маркерлік гені бар *L. edodes* саңырауқұлақтарының екі экзо-1,4-β-глюканаза гендері (*cel7A* және *cel6B*) бар интегралды вектор құрастырылды.

Алғаш рет ашытқы хромосомаларына интеграцияланған целлюлитикалық ферменттердің гендерімен жаңа тұрақты ашытқы штаммы жасалды. Бұл штамм целлюлолитикалық ферменттер гендерінің үздіксіз экспрессиясын және экспрессия өнімдерінің қоршаған ортаға секрециялануын қамтамасыз етеді.

Целлюлаза гендерін экспрессиялайтын *S. cerevisiae* рекомбинантты штаммы құрамында көміртек көзі ретінде авицел немесе карбоксиметил целлюлозасы (CMC) бар синтетикалық ортада өсе алатындығы анықталды. Рекомбинанттық штамм 5% авицелды субстрат ретінде қолдану барысында 5,62 г/л этанол

(теориялық максималды кірістің 22%) шығарды, ал 5% алдын-ала өңделген бидай сабанынан 1,43 г/л этанол (теориялық максималды кірістің 14%) өндірді.

**Жұмыстың теориялық және практикалық маңызы.** Ашытқы жүйелерінде термотұрақты целлюлолитикалық саңырауқұлақтардың гендер экспрессиясын сипаттау және оңтайландыру гендер экспрессиясын реттеу заңдылықтарын түсіну үшін үлкен теориялық маңызы бар. Жұмыстың практикалық маңыздылығы, қалпына келтірілетін және арзан целлюлозаның шикізат көздерінен (дәнді дақылдар сабаны, қағаз қалдықтары, үгінділер және басқалар) этанол алу үшін целлюлаза гендерін тасмалдаушысы болып табылатын рекомбинантты ашытқы штамдарын қолдану перспективаларына байланысты.

**Қорғауға шығарылған негізгі қағадалар:**

- *A. niger* эндо-1,4-β-глюканазасының YEGAp эписомальді плазмидалық вектордағы экспрессиясы ашытқы жасушаларының культурасының өсуін едәуір баяулатты. Сонымен қатар, ашытқы хромосомасының *HO* локусында осы ферменттің тұрақты гендік экспрессиясы өсудің тежелуіне алып келмеді, ал шығарылған ферменттің белсенділігі инкубацияның бүкіл уақытында тұрақты болды (880 бірлік/мг).

- TaBGL1 экспрессиялайтын рекомбинантты штамдар целлобиозалы ортада жақсы өседі және барлық қол жетімді қантты пайдаланады. Целлобиозадан этанолдың орташа шығымдылығы 7,6 г/л құрайды (теориялық максимумның 77%).

- TaBGL1 секрециясының тиімділігі және гликозилденуі бастапқы ашытқы штаммның генетикалық фоны мен культуралық ортадағы көміртек көзіне байланысты.

- Жасалған рекомбинантты штамдар өсу қарқыны, жоғары температураға төзімділік, жоғары секреторлық белсенділік, этанолға жоғары төзімділік және лигноцеллюлоза гидролизаттарында жиі кездесетін ингибиторлық қосылыстарға жоғары тұрақтылық сияқты өндірістік маңызды сипаттамаларды көрсетті.

- Целлобиозаны ферментациялаудың клеткаішілік жолдарын интеграциялау арқылы шығарылған рекомбинантты штамм Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* эффективті түрде конститутивті TEF1 және PGK1 промоторының бақылауындағы целлодекстриндердің мембраналық тасмалдаушы гені *cdt1* және *tabgl1* гендерін экспрессиялайды.

- Рекомбинантты штамм Y-2034 /*tabgl1•cdt1-egfp* целлобиоза бар ортада жақсы өседі және 2% целлобиозадан 5,55 г/л мөлшерінде этанол шығарады, бұл теориялық максимумның 52% құрайды.

- δ-тізбегінің негізінде *A. niger* саңырауқұлағының эндо-1,4-β-глюконаза гені және флеомицинге (*sh ble*) төзімді доминантты маркерлік гені бар *L. edodes* саңырауқұлағының *cel7A* және *cel6B* экзо-1,4-β-глюканаза гендері бар интегралды вектор құрастырылды.

- *T. aurantiacus* саңырауқұлағының 1,4-β-глюкозидаза, *A. niger* саңырауқұлағының эндо-1,4-β-глюканаза және *L. edodes* саңырауқұлағының экзо-1,4-β-глюканаза гендерін коэкспрессиялайтын *S. cerevisiae* рекомбинантты штамдары құрастырылды.

- Y-2034-TaBgl1/*eng1•cel6B•cel7A* рекомбинантты ашытқы штамдарын қолдану арқылы лигноцеллюлозды шикізатты тікелей конверсиялау мүмкіндігі көрсетілген, сол арқылы 5% авицелдан 5,62 г/л этанол өндірілді, ал 3 тәулік ішінде 5% алдын-ала өңделген бидай сабанынан 1,43 г/л этанол (теориялық максималды кірістің 14%) өндірілді.

**Зерттеудің негізгі нәтижелері және қорытынды:**

1. *A. niger* эндо-1,4-β-глюканазасының YEGAp эписомальді плазмидалық вектордағы экспрессиясы ашытқы жасушаларының культурасының өсуін едәуір баяулатты. Сонымен қатар, ашытқы хромосомасының HO локусында осы ферменттің тұрақты гендік экспрессиясы өсудің тежелуіне себеп болмады, ал шығарылған ферменттің белсенділігі инкубацияның бүкіл уақытында тұрақты болды (880 бірлік/мг).

2. p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* интеграциялық вектор негізінде экспрессияланған ENG1, N-гликозилденуінен басқа O-гликозилдену сайттарында қант қалдықтарын қамтыды. Ал эписомальді плазмидасында экспрессияланған ENG1 рекомбинантты ашытқыларда тек N-гликозилденген формада болды. Интегральды векторлы рекомбинантты ашытқы штаммын үздіксіз дақылдау барысында O -гликозилденген ENG1 формасы эписомальді векторы бар штаммен бөлінетін N-гликозилденген формасымен салыстырғанда тұрақты белсенділікті сақтайды деген болжам жасалды.

3. ENG1 pH 6,0 деңгейінде оңтайлы каталитикалық белсенділікке ие екендігі және pH 5.0–9.0 аралығында тұрақты екендігі көрсетілді. Каталитикалық белсенділік үшін ферменттің оңтайлы температурасы pH 6,0 жағдайында 70°C құрады. Ферменттің бастапқы белсенділігінің 95% -дан астамы ферментті 60°C температурада 2 сағат инкубациялағаннан кейін сақталды.

4. Ашытқылардың *HO* локусына интеграциялау үшін, конститутивті GAPDH промоторы мен терминаторының бақылауында ашытқының α-факторлық сигналдық пептиді жалғанған *T. aurantiacus* саңырауқұлағының 1,4-β-глюкозидаза гені (*tabgl1*) және генетицинге төзімділік гені (G418) бар интегралды вектор құрастырылды.

5. Алғаш рет *tabgl1* генін тұрақты интеграциялау арқылы целлобиозаны ферментациялау мақсатында төрт өнеркәсіптік рекомбинантты *S. cerevisiae* штамдары алынды. Алынған рекомбинантты *S. cerevisiae* штамдары *T. aurantiacus* саңырауқұлағының целлобиозаны глюкозаға гидролиздеуге қабілетті 1,4-β-глюкозидазасын (TaBGL1) секрециялайды, содан кейін глюкозаны этанолға дейін ашытады. Рекомбинантты штамдар көмірсутегінің жалғыз көзі ретінде целлобиозаны қолдана отырып, орташа алғанда 7,6 г/л этанол (теориялық максималды кірістің 77%) өндіретіні көрсетілді.

6. Бөлінген TaBGL1-дің гликозилденуі ашытқы штамдарының генетикалық фонына және негізінен культуралық ортадағы көміртегі көздеріне (глюкоза немесе целлобиоза) байланысты екендігі көрсетілді. TaBGL1-дің N-гликозилденуінің табиғатындағы айырмашылықтар ферменттердің белсенділігінің өзгеруіне әкелуіне қарамастан, термотұрақтылығы, pH тұрақтылығы, температура және pH оптимумдары сияқты биохимиялық қасиеттерге әсер етпейді.

7. Құрастырылған рекомбинантты штамдар этанол, фурфорол және $H_2O_2$ әртүрлі концентрацияларына, сонымен қатар жоғарғы температураға осмотолеранттылық және төзімділік көрсететіндігі көрсетілді.

8. Ашытқылардың *HO* локусына интеграциялау үшін, ашытқының α-факторлық сигналдық пептиді жалғанбаған *T. aurantiacus* саңырауқұлағының 1,4-β-глюкозидаза гені (*tabgl1*) және күшті конститутивті TEF1 және PGK1 промоторының бақылауындағы жасыл флуоресцентті белогы (eGFP) бар *N. crassa* саңырауқұлағының гибридті целлодекстриндердің мембраналық тасмалдаушы гені (*cdt1*) және генетицинге төзімділік гені (G418) бар интегралды вектор құрастырылды.

9. Алғаш рет конститутивті TEF1 және PGK1 промоторының бақылауындағы целлодекстриндердің мембраналық тасмалдаушы гені *cdt1* және *tabgl1* генін эффективті түрде экспрессиялайтын Y-2034*/tabgl1•cdt1-egfp* рекомбинантты штамм құрастырылды. Рекомбинантты штамм Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* целлобиоза бар ортада жақсы өсетіндігі көрсетілді және 2% целлобиозадан 5,55 г/л мөлшерінде этанол шығарды, бұл теориялық максимумның 52% құрайды.

10. δ-тізбегінің негізінде *A. niger* саңырауқұлағының эндо-1,4-β-глюканаза гені және флеомицинге (*sh ble*) төзімді доминантты маркерлік гені бар *L.edodes* саңырауқұлағының екі *cel7A* және *cel6B* экзо-1,4-глюканаза гендері бар интегралды вектор құрастырылды.

11. Алғаш рет *T. aurantiacus* саңырауқұлағының 1,4-β-глюкозидаза , *A. niger* саңырауқұлағының эндо-1,4-β-глюканаза және *L. edodes* саңырауқұлағының экзо-1,4-β-глюканаза гендерін коэкспрессиялайтын *S. cerevisiae* рекомбинантты штамдары құрастырылды.

12. Рекомбинантты ашытқы штаммы Y-2034-TaBgl1/*eng1•cel6B•cel7A* көмегімен лигноцеллюлозды шикізатты анаэробты жағдайда биоэтанолға тікелей айналдыру мүмкіндігі көрсетілді. Бұл штамм авицелды этанолға тиімді түрде айналдырды, ал 3 күнде этанолдың концентрациясы 5,62 г/л-ге жетті. Алдын ала өңделген бидай сабанын конверсиялау нәтижесінде спирттің 1,43 г/л концентрациясына қол жеткізілді.

**Жұмыстың сыннан өтуі**. Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері төмендегі халықаралық ғылыми конференциялар мен симпозиумдарда баяндалды және талқыланды:

- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» халықаралық конференцияларында, ҚазҰУ Әл-Фараби, Алматы, 2016-2019ж.а;
- «Микробиология мен вирусологияның қазіргі заманғы биоиндустрияға қосқан үлесі» атты халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференциясында (2016, Алматы, Қазақстан);
- «European *Biotechnology Congress*» халықаралық конференциясында (2017, Дубровник, Хорватия).

**Басылымдар**. Диссертацияның негізгі мазмұны 22 жарияланымнан тұрады, олардың қатарында импакт-факторы нөлден төмен емес Web of Science немесе Scopus дерекқорында индекстелетін рецензияланған шетелдік ғылыми журналда 2 мақала және 2 тезис, ҚР БҒМ Білім және ғылым саласындағы бақылау комитеті

ұсынған ұлттық ғылыми журналдарда 6 мақала және халықаралық конференцияларда 12 тезис жарияланды. Диссертациялық жұмыстың нәтижелері бойынша «Ашытқыларда гендер экспрессиясы үшін құрастырылған интегративті плазмидалық вектор» № 2017 / 0230.2 пайдалы модельге ҚР 1 патенті алынды.

**Диссертацияның құрылымы**. Диссертация 145 парақта ұсынылған және белгілеулер мен қысқартулардан, кіріспе, әдебиетке шолу, материалдар мен әдістер, нәтижелер мен талқылаулардан, қорытынды, пайдаланылған әдебиеттер тізімінің 260 атауынан соның ішінде 248-і ағылшын тілінде; 10 кесте, 55 сурет және 1 қосымшадан тұрады.