Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 579.25: 602.3

На правах рукописи

СМЕКЕНОВ ИЗАТ ТЕМИРГАЛИЕВИЧ

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

6D070100 - Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора философии (PhD), доктора по профилю

Научный консультант:
Бисенбаев А.К., д.б.н.,
академик НАН РК;

Зарубежный научный
консультант:
Сапарбаев М.К., PhD,
профессор института
Густава Русси (Вильжюиф,
Франция)

Республика Казахстан
Алматы, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ		6
ВВЕДЕНИЕ		7
1	**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**	14
1.1	Биотопливо	14
1.1.1	Биотопливо первого поколения (1G)	14
1.1.2	Биотопливо второго поколения (2G)	15
1.1.3	Сырье для 2G технологии	16
1.1.4	Предварительная обработка лигноцеллюлозного сырья и ингибиторы процесса ферментации	18
1.1.4.1	Ингибирующие эффекты производных фурана	19
1.1.4.2	Ингибирующие эффекты слабых кислот	20
1.1.4.3	Ингибирующие эффекты фенолов	21
1.1.4.4	Ингибирующие эффекты высоких концентраций этанола	21
1.1.4.5	Ингибирующие эффекты высокой осмолярности	21
1.1.4.6	Ингибирующие эффекты высоких температур	22
1.2	Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*	22
1.2.1	Жизненный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*	23
1.2.1.1	Пролиферация: цикл митотической клетки	23
1.2.1.2	Переходы: спаривание и споруляция	24
1.2.1.3	Специализация клеток: явное программирование и экзогенный ответ	26
1.2.1.4	Гомоталлизм и гетероталлизм: Взаимопревращение типов спаривания	28
1.2.1.4.1	Типы спаривания: *MAT* локус дрожжей *S. cerevisiae*	29
1.2.1.4.2	*HO* локус дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*	30
1.2.2	Ту элементы	32
1.2.3	Генетические разнообразия промышленных штаммов дрожжей и пути поддержания генетического разнообразия дрожжей	33
1.2.3.1	Происхождение дрожжевого разнообразия	34
1.2.3.2	Поколение искусственного разнообразия	36
1.2.3.2.1	Прямое спаривание	36
1.2.3.2.2	Редкое спаривание	37
1.2.3.2.3	Массовое спаривание и перетасовка генома	38
1.2.3.2.4	Слияние протопластов	39
1.2.3.2.5	Мутагенез	40
1.2.3.2.6	Направленная эволюция	41
1.3	Целлюлазы и их роли в целлюлозном гидролизе	42
1.3.1	Эндоглюканазы	44
1.3.2	Экзоглюканазы	44
1.3.3	β-глюкозидазы	45
1.4	Мембранный переносчик целлодекстринов гриба *Neurospora*	

	crassa	45
2	**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**	47
2.1	Материалы исследования	47
2.2	Выделение нуклеиновых кислот из мицелиев грибов	50
2.3	Выделение мРНК	50
2.4	Реакция обратной транскрипции (ОТ)	51
2.5	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	51
2.6	Рестрикция ДНК и ее элюирование	52
2.7	Лигирование вставляемого фрагмента ДНК и вектора	53
2.8	Приготовление компетентных клеток *Escherichia coli*	53
2.9	Трансформация клеток *Escherichia coli*	54
2.10	Выделение плазмид методом щелочного гидролиза	55
2.11	Приготовление компетентных дрожжевых клеток	55
2.12	Трансформация дрожжевых клеток	55
2.13	Выделение геномной ДНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*	56
2.14	Оценка стрессоустойчивости промышленных штаммов дрожжей	56
2.15	Определение скорости роста в аэробных условиях культивирования	57
2.16	Ферментативное производство этанола из целлобиозы	57
2.17	Осаждение белков из культуральной жидкости и вестерн-блоттинг	58
2.18	Дегликозилирование белков с Endo H	59
2.19	Методы определения активности фермента эндо-1,4-β-глюканазы	59
2.19.1	Метод определения эндоглюканазной активности с применением 3,5-динитросалициловой кислоты	60
2.19.2	Определения эндоглюканазной активности методом SDS-ПААГ-зимограммы	60
2.19.3	Чашечный метод определения эндоглюканазной активности	60
2.20	Количественная оценка активности β-глюкозидазы	61
2.21	Количественная оценка активности целлобиогидролазы	61
2.22	Щелочная предобработка соломы	61
2.23	Ферментативное производство этанола из авицел и предобработанной соломы	61
3	**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**	63
3.1	Сравнение экспрессии гена 1,4-β-эндоглюканазы гриба *Aspergillius niger* в разных экспрессионных векторных системах	63
3.1.1	Создание рекомбинантного штамма *Saccharomyces cerevisiae* с помощью YEGAp/*eng1* и p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* экспрессионных векторов	63
3.1.2	Анализ экспрессии рекомбинантной эндоглюканазы ENG1 в	

	экспрессионном штамме *Saccharomyces cerevisiae*	67
3.1.3	Анализ N-гликозилирования секретируемого фермента	70
3.1.4	Характеристика ферментативной активности рекомбинантного ENG1	73
3.2	Создание промышленных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с геном *tabgl1* гриба *Thermoascus aurantiacus* и оценка их способности сбраживать целлобиозу в этанол	76
3.2.1	Конструирование интегративного экспрессионного вектора, содержащий ген *tabgl1,* для интеграции в *HO* локус генома дрожжей	77
3.2.2	Создание промышленных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae,* экспрессирующие *tabgl1* ген с сигнальным пептидом альфа-фактора дрожжей	77
3.2.3	Сравнение темпов роста рекомбинантных промышленных штаммов дрожжей и ферментативной активности TaBGL1	80
3.2.4	Анализ характера гликозилирования TaBGL1, синтезированного различными рекомбинантными штаммами *Saccharomyces cerevisiae*	83
3.2.5	Изучение особенностей роста рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae* и оценка выхода этанола в анаэробных условиях в присутствии целлобиозы в качестве единственного источника углеводородов	87
3.2.6	Оценка устойчивости рекомбинантных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к индивидуальным стрессовым факторам	89
3.3	Создание промышленного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, коэкспрессирующий β-глюкозидазу гриба *Thermoascus aurantiacus* и мембранный переносчик целлодекстринов гриба *Neurospora crassa*	90
3.3.1	Выделение кДНК гена мембранного переносчика целлодекстринов гриба *Neurospora crassa* (CDT1)	92
3.3.1.1	Компьютерный анализ мРНК и аминокислотной последовательности мембранного транспортера целлодекстрина CDT1	92
3.3.1.2	Амплификация кДНК мембранного транспортера целлодекстрина гриба *Neurospora crassa* с помощью ОТ-ПЦР технологии	91
3.3.1.3	Создание рекомбинантной ДНК-конструкции для экспрессии гена *cdt1*	94
3.3.1.4	Экспрессия рекомбинантного белка мембранного переносчиков целлодекстринов гриба *Neurospora crassa* в *E. coli*	96
3.3.1.5	Очистка рекомбинантного белка CDT1 из *E. coli* до гомогенного состояния	98

3.3.1.6 Анализ рекомбинантного белка CDT1 с помощью тандемной масс-спектрометрии с использованием nano-LC/MS/MS технологии 98
3.3.2 Создание конструкции p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO* 99
3.3.3 Создание промышленного штамма Y-2034 *Saccharomyces cerevisiae* с генами *tabgl1* гриба *Thermoascus aurantiacus* и *cdt1* гриба *Neurospora crassa* 106
3.3.4 Анализ экспрессии β-глюкозидазы гриба *Thermoascus aurantiacus* и CDT1 гриба *Neurospora crassa* в производственном штамме *S. cerevisiae* в *HO* локусе хромосомы 108
3.3.5 Анализ трансформированного промышленного штамма дрожжей Y-2034/*tabgl1*•*cdt1*-*egfp* на способность расти и производить этанол в жидкой среде с целлобиозой 110
3.4 Производство этанола промышленным штаммом *Saccharomyces cerevisiae*, коэкспрессирующий гены целлюлаз 115
3.4.1 Конструирование интегрального плазмидного вектора δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH-δ 117
3.4.2 Создание промышленных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* с генами *tabgl1* гриба *Thermoascus aurantiacus, eng1* гриба *Aspergillius niger, cel6B* и *cel7A* гриба *Lentinula edodes* 118
3.4.3 Анализ экспрессии ENG1, CEL6B, CEL7A в промышленном штамме *Saccharomyces cerevisiae* Y-2034-TaBgl1/*eng1*•*cel6B*•*cel7A* методом определения ферментационной активности 119
ВЫВОДЫ 124
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 126
ПРИЛОЖЕНИЯ 144

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ADH – alcohol dehydrogenases (алкогольдегидрогеназа)
ALDH – aldehyde dehydrogenases (альдегиддегидрогеназа)
CBM – carbohydrate-binding module (углевод связывающий домен)
CBP – consolidated bioprocessing (консолидированная биопереработка)
CD – catalytic domain (каталитический домен)
CO – carbon monoxide (монооксид углерода)
eGFP – enhanced green fluorescent protein (усиленный зеленый флуоресцентный белок)
GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)
GRAS – Generally Recognized As Safe (В целом признанные безопасным)
HGT - horizontal gene transfer (горизонтальный перенос гена)
HMF – hydroxymethylfurfural (оксиметилфурфурол)
InDels – insertion or deletion events of relatively short pieces of DNA (события вставок или делеций относительно коротких фрагментов ДНК)
NO_2 – nitrogen dioxide (диоксид азота)
OD – optical density (оптическая плотность)
PDH – pyruvate dehydrogenase (пируватдегидрогеназа)
PGK1 – phosphoglycerate kinase 1 (фосфоглицераткиназа 1)
pHi – intracellular pH (внутриклеточный pH)
PM10 – частицы вещества диаметром от 10 микрометра и меньше
pNP – p-nitrophenyl (p-нитрофенол)
pNPG – 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside (4-нитрофенил β-D-глюкопиранозид)
pNPC – 4-Nitrophenyl β-D-cellobioside (4-нитрофенил β-D-целлобиозид)
SD – Synthetic Defined (синтетический)
SHF – separate hydrolysis and fermentation (раздельный гидролиз и ферментация)
SSF – simultaneous saccharification and fermentation (одновременное осахаривание и ферментация)
TEF1 – translation elongation factor 1 alpha (трансляционный фактор элонгации 1-альфа 1)
WGD - whole-genome duplication (дупликация целого генома)
μmax – maximum specific growth rate (максимальная специфическая скрость роста)
АТФ – аденозинтрифосфат
SDS – sodium dodecyl sulfate (ДСН - додецилсульфат натрия)
ПААГ – полиакриламидный гель
ед. – единица
ИПТГ – изопропилтиогалактозид
кДа – килодальтон
КМЦ – карбоксилметилцеллюлоза
об/мин – обороты в минуту
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ВВЕДЕНИЕ

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) [1]. 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 [2], 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 [3]. 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 [4]. 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 [5-8]. 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* [9,10].

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 [11], 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 [12]. 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 [13]. 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* [14-17]. 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 [18]. 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 [19].

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 [20]. 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 [21], антикоагулянта-гирудина [22], глюкоамилазы [23]. 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 [24-26]. 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 [27, 28]. Несколько исследований были посвящены селекции промышленных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, устойчивых к ингибирующим соединениям и способных к ферментации лигноцеллюлозных сахаров [29]. 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 [30]. Штамм дрожжей Y-2034 может сбраживать различные сахара, обычно присутствующие в различных видах сырья пищевых отходов и в процессах ферментации этанола [31, 32]. Штаммы ATCC 24860 и YB-2625 считаются наиболее эффективными ферментерами ксилулозы [33, 34].

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 в 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.

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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биотопливо

Жидкие биотоплива включают биоспирты, такие как этанол, бутанол и биодизель. Они производятся в ферментационных процессах, в которых участвуют микробные биокатализаторы, такие как дрожжи или бактерии, превращающие сахара в спирты. Среди трех биоспиртов, этанол является одним из наиболее распространенных видов топлива, тогда как другие производятся в меньшей степени [35].

Сегодня этанол является наиболее важным жидким биотопливо. Он использовался в первых автомобильных двигателях и рассматривался в качестве кандидата на замену ископаемого топлива с момента энергетического кризиса в 1970-х годах [36]. Биоэтанол является очень привлекательным биотопливом для автомобильной промышленности из-за его способности смешиваться с нефтяным бензином, и он может использоваться в низкоконцентрированных смесях (<10%) в транспортных средствах без изменений [37]. Использование смесей этанола имеют преимущества, так как происходит уменьшение загрязнения воды и не оказывается значительного отрицательного воздействия на общественное здравоохранение или окружающую среду, образуя низкий уровень выбросов CO_2, несгоревших углеводородов, окиси углерода, оксидов азота и летучих органических соединений. Другим преимуществом использования этанола в качестве транспортного топлива является то, что он предлагает высокий октан и высокую теплоту испарения, что приводит к большей выработке энергии и повышению производительности [38, 39].

1.1.1 Биотопливо первого поколения (1G)

Биоэтанол первого поколения в настоящее время является преобладающим биотопливом и производится из сахарного тростника и крахмала кукурузы. При его производстве промышленные титры этанола на сахарозе достигают 93% от стехиометрического максимума, при использовании *S. cerevisiae* и других близкородственных штаммов дрожжей в качестве ферментирующих организмов. Хотя процесс производства этанола из этих источников является высокоэффективным, целлюлозная биомасса (сухое растительное вещество) имеет большую ресурсную базу, чем кукуруза или сахарный тростник [40, 41].

США и Бразилия являются крупнейшими производителями биоэтанола 1G, внося свой вклад в 72,6% от общего объема производства биоэтанола во всем мире (рисунок 1).

Эта статистика 2017 года отражает производство топливного этанола в основных странах и регионах. В 2017 году Соединенные Штаты произвели наибольшее количество топливного этанола в мире, в результате чего было произведено около 15,8 млрд. галлонов. С более чем семью миллиардами галлонов Бразилия заняла второе место.

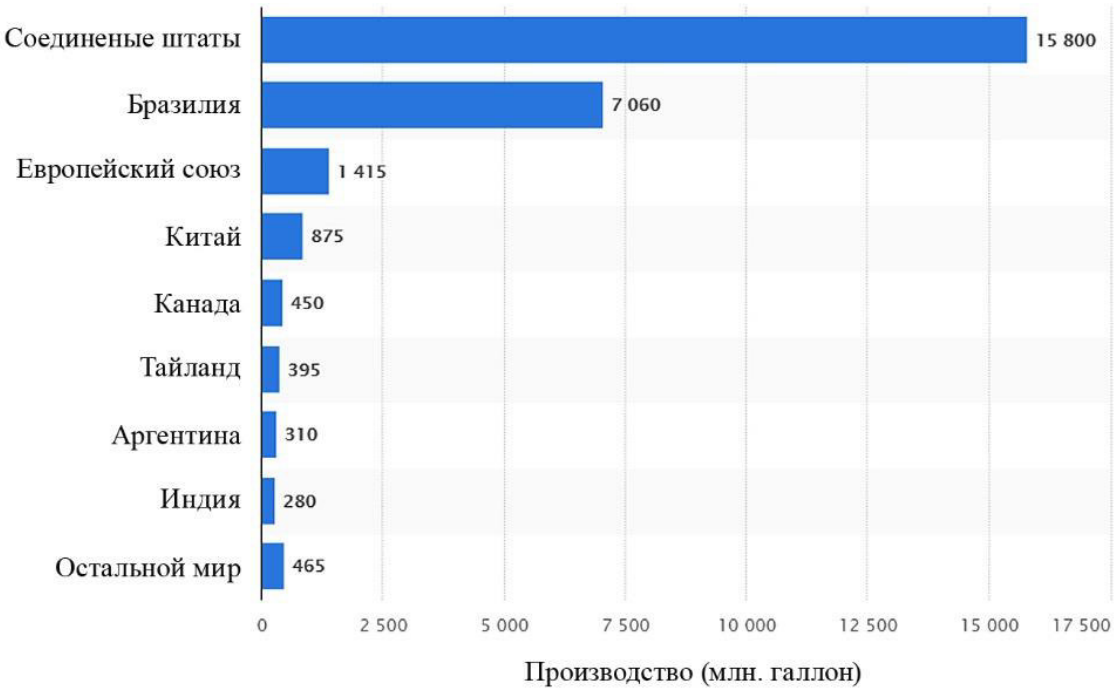


Рисунок 1 – Рейтинг стран, основанных на ежегодном производстве биоэтанола

Примечание – Составлено автором на основе источника [42]

1.1.2 Биотопливо второго поколения (2G)

Биотопливо второго поколения (2G) становится важным альтернативным возобновляемым топливным ресурсом из-за ее низкой стоимости и изобилия растительной биомассы, ссылаясь конкретно на лигноцеллюлозную биомассу [43]. Биотоплива 2G, также известные как передовые биотоплива, позволяют быстро возобновлять органический углерод как часть углеродного цикла. Было подсчитано, что 419 миллиардов литров биоэтанола можно производить каждый год из отходов урожая (целлюлозной биомассы) [44]. При производстве этанола особый интерес представляют разработки тех процессов, которые основаны на ферментативном гидролизе, поскольку они являются специфическими [45] и приводят к уменьшению образования сточных вод по сравнению с кислотным гидролизом [46].

Технология целлюлозного биоэтанола 2G все еще находится на стадии разработки, и одним из основных технологических препятствий для более широкого использования лигноцеллюлозы для производства биотоплива и химических веществ является отсутствие экономически осуществимых технологий [47]. Существует четыре биологически опосредованных события, которые должны произойти при конверсии лигноцеллюлозы в биоэтанол, а именно: предобработка биомассы, производство деполимеризующих ферментов (целлюлаз и гемицеллюлаз), гидролиз полисахаридных компонентов предварительно обработанной биомассы, ферментация присутствующих гексозных и пентозных сахаров [48].

Отдельный гидролиз и ферментация (SHF) являются центральными этапами обработки в биологических процессах, поскольку они позволяют оптимально управлять каждым шагом. Недостатком этого процесса является торможение конечным продуктом, в результате чего накопление глюкозы ингибирует целлюлолитические ферменты, вызывая низкие ферментативные результаты гидролиза. Этот последний недостаток можно решить, проведя конкурирующую технологию, одновременного осахаривания и ферментации (SSF), где обе стадии происходят одновременно в одном и том же сосуде. Основным преимуществом этого процесса SSF является то, что происходит непрерывное удаление глюкозы микроорганизмами, что сводит к минимуму торможение конечным продуктом, из-за чего растет скорость ферментационного гидролиза и достигаются общие лучшие результаты [49]. Кроме того, процесс SSF потенциально снижает капитальные затраты, поскольку в установке сочетаются реакции брожения и гидролиза, где единственными капитальными затратами должны быть только один набор реакторов вместо двух [50]. Экспериментальные выходы этанола из сахаров С5 и С6 для SSF обычно выше, чем для SHF. Недостатком этого процесса являются разные оптимальные условия для ферментационного гидролиза и ферментации.

1.1.3 Сырье для 2G технологии

Лигноцеллюлоза относится к растительному сухому веществу (биомасса), так называемой лигноцеллюлозной биомассе. Это самое распространенное сырье на Земле для производства биотоплива, в основном биоэтанола. Она состоит из углеводных полимеров целлюлозы и гемицеллюлозы, и ароматического полимера лигнина (рисунок 2). Составы и проценты данных компонентов варьируют от одного вида растений к другому [51].

Целлюлоза является неразветвленным гомополисахаридом, состоящий из единиц D-глюкопиранозила. Гемицеллюлозы представляют собой разветвленные гетерополисахариды, состоящие как из гексозных, так и пентозных остатков сахаров. Лигнин, нерастворимый в воде ароматический полимер, состоящий из фенилпропановых субъединиц, связанных различными типами межцепных связей, из которых эфирные связи являются наиболее распространенными. По сравнению с крахмалом, полисахариды лигноцеллюлозы более устойчивы к гидролизу. Кроме того, древесная биомасса обычно более устойчива к деградации, чем другие типы лигноцеллюлозы. Хвойные породы обычно сложнее гидролизуются, чем твердые или сельскохозяйственные остатки [52-55].

В общем, лигноцеллюлозное сырье разделено на три основные категории: сельскохозяйственные остатки (например, остатки культур, сахарные тростники), лесные остатки, травянистые и древесные энергетические культуры [56]. В качестве субстратов для биотоплива могут использоваться сельскохозяйственные побочные продукты, такие как жом, стержень кукурузного початка, грубые корма для скота, древесные щепки, пшеничная солома и т.д. (таблица 1) [57].

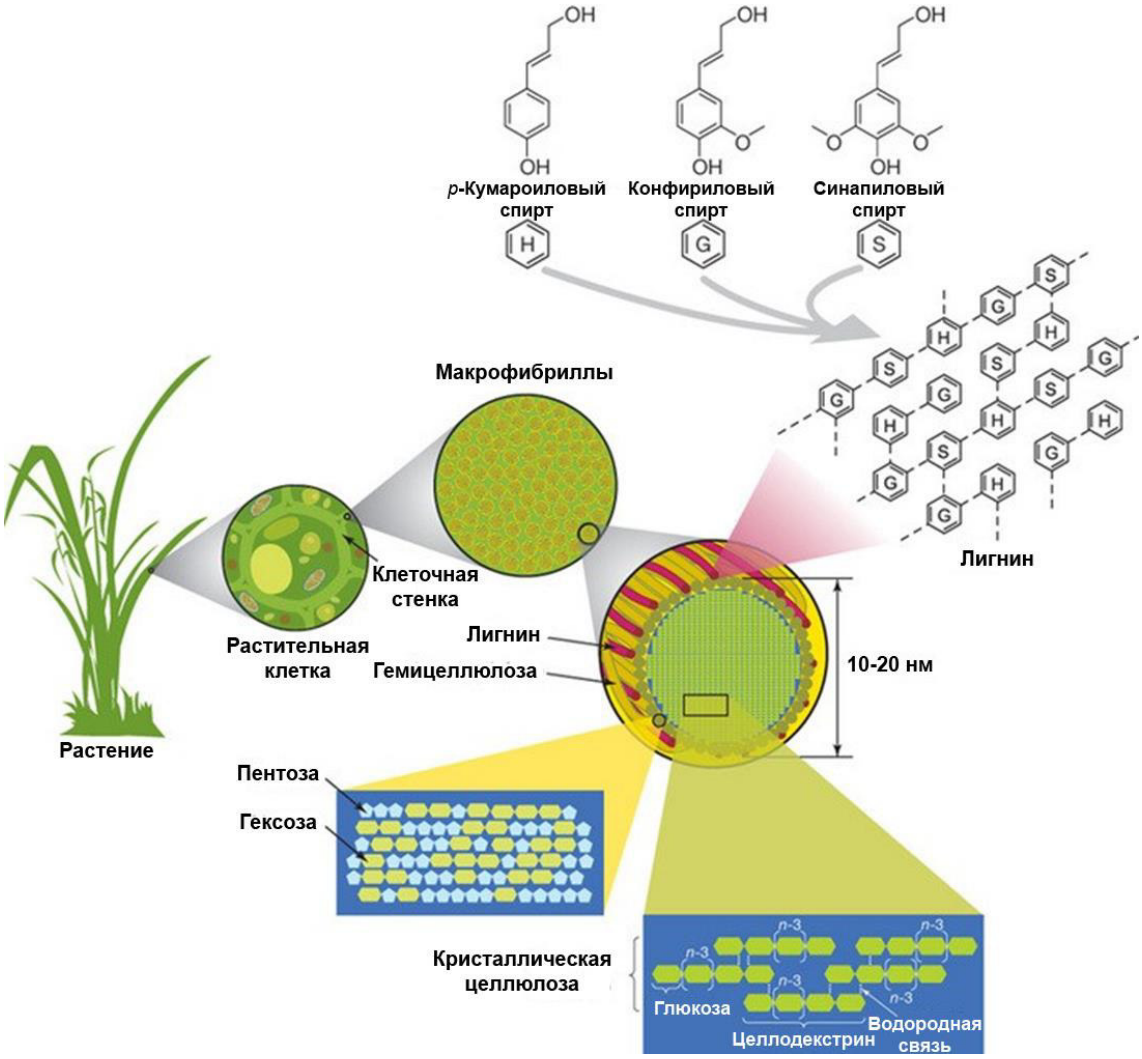


Рисунок 2 – Схематическое изображение 3D-структуры лигноцеллюлозного комплекса и химической структуры основных соединений в растельных клеточных стенках

Примечание – Составлено автором на основе источника [58]

Эти богатые и привлекательные субстраты для производства биотоплива экономически и экологически выгодны в процессах ферментации, но перевариваемость целлюлозы, присутствующей в лигноцеллюлозной биомассе, затруднена физико-химическими, структурными и композиционными факторами [59]. Одной из проблем производства целлюлозного этанола является то, что лигноцеллюлозные материалы имеют сложные структуры и обладают высокой устойчивостью к ферментативному гидролизу на моно- и ди-сахариды. Целлюлозу сложнее превращать в ферментируемые сахара, чем биомассу крахмала, потому что целлюлоза является высококристаллической и компактной по своей природе, и в тоже время гемицеллюлоза действует как барьер для достижения целлюлазами целлюлозы [60], и присутствие лигнина, который связывает целлюлозу и гемицеллюлозу вместе, образовывая непреодолимый

барьер [61], затрудняет деградирование путем микробной атаки и гидролиза целлюлитическими ферментами в его мономерные, ферментируемые сахара, в отличие от крахмальных субстратов.

Таблица 1 – Состав общего лигноцеллюлозного сырья и отходов (вес. % от сухой биомассы) [57, P. 3714]

Лигноцеллюлозный материал	Целлюлоза (%)	Гемицеллюлоза (%)	Лигнин (%)
Стебли лиственных пород	40-55	24-40	18-25
Хвойные стебли	45-50	25-35	25-35
Початки кукурузы	45	35	15
Злаки	25-40	35-50	10-30
Бумага	85-99	0	0-15
Пшеничная солома	30	50	15
Сортированный мусор	60	20	20
Листья	12-20	80-85	0
Хлопковые семена	80-95	5-20	0
Газета	40-55	25-40	18-30
Макулатура (химическая масса)	60-70	10-20	5-10
Первичные твердые вещества в сточных водах	8-15	Н/п	Н/п
Твердый навоз крупного рогатого скота	1.6-4.5	1.3-3.3	2.5-5.7
Прибрежная бермуградсса	25	35.7	6.4
Просо	45	31.4	12
Свиные отходы	6.0	28	Н/п
Примечание – Н/п - Не применимо			

1.1.4 Предварительная обработка лигноцеллюлозного сырья и ингибиторы процесса ферментации

Предварительная обработка лигноцеллюлозной биомассы направлена для разделения лигнина и гемицеллюлозы, для уменьшения количества кристаллической целлюлозы, так как кристаллические части целлюлозы более устойчивы к гидролизу, чем аморфные части, для увеличения пористости лигноцеллюлозы и генерации мономерных сахаров для последующей стадии ферментации, с минимальным химическим разрушением ферментируемых сахаров, необходимых для производства этанола [62]. Гидролиз лигноцеллюлозы обычно достигается с помощью предварительной обработки с кислотой, что в первую очередь приводит к гидролизу гемицеллюлозы с последующим гидролизом оставшихся целлюлоз. Выделение мономерных сахаров во время предварительной обработки сопровождается образованием ингибиторов, которые сильно влияют на рост ферментирующих микроорганизмов и влияют на выход этанола [63-65]. Следовательно, необходимо использовать устойчивые к ингибиторам микроорганизмы.

Предварительная обработка лигноцеллюлозной биомассы генерирует широкий спектр соединений. Они растворяются в сиропе, который может

содержать уксусную, муравьиную и левуновую кислоты, а также фураны и фенольные соединения, высвобождаемые во время предварительной обработки. D-глюкозу в основном получают путем гидролиза целлюлозы. D-глюкоза, D-галактоза, D-маннозы и D-рамнозы (гексозы), а также D-ксилоза и L-арабиноза (пентозы) высвобождаются из фракции гемицеллюлозы. Уронические кислоты, такие как D-глюкуроновая и 4-O-метилглюкуроновая кислоты также получаются при гидролизе гемицеллюлозы. Обработка гидролизата может привести к дальнейшей деградации лигнина и мономерных сахаров к трем основным группам соединений, которые ингибируют последующую стадию ферментации: (I) производные фурана (2-фуральдегид и 5-гидроксиметил-2-фуральдегид); (II) слабые кислоты (главным образом уксусная кислота, муравьиная кислота и левулиновая кислота); и (III) фенольные соединения (рисунок 3) [62, С. 341].

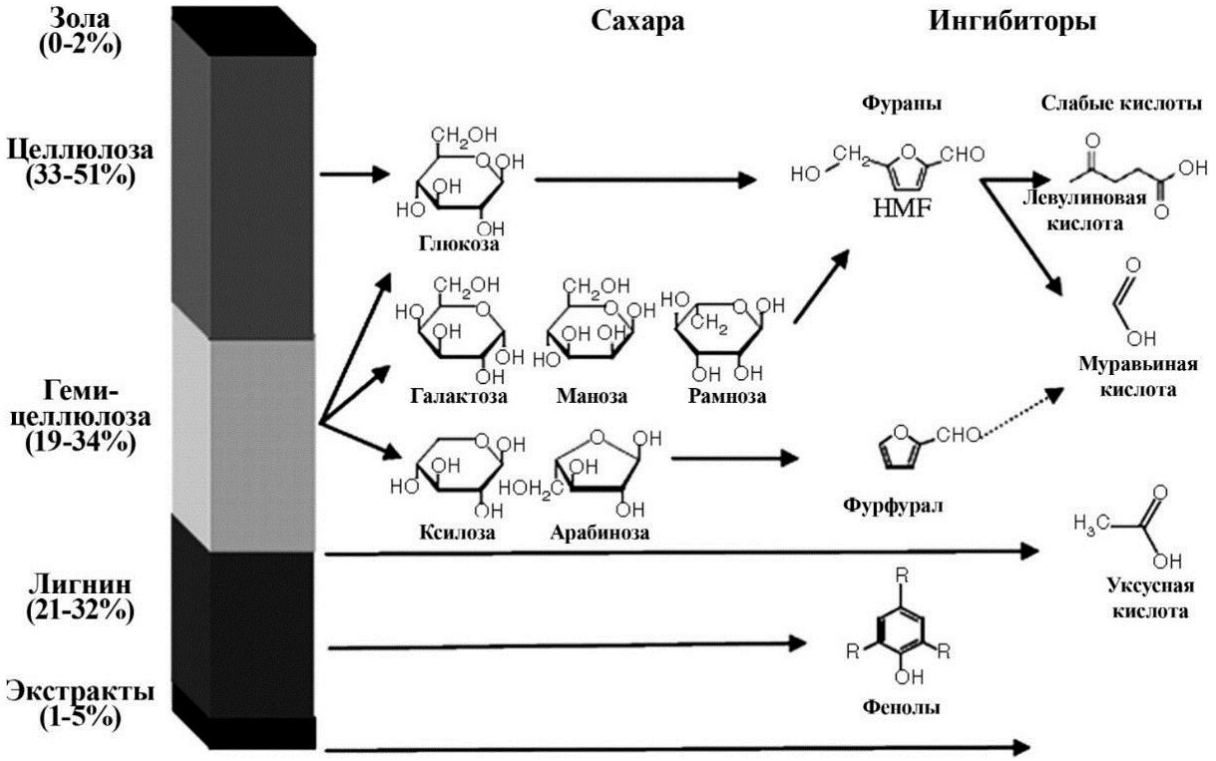


Рисунок 3 – Средний состав лигноцеллюлозной биомассы и основных производных продуктов гидролиза

Примечание – Составлено автором на основе источника [62, P. 341]

1.1.4.1 Ингибирующие эффекты производных фурана

Фурановые соединения 5-гидроксиметил-2-фуральдегид (HMF) и 2-фуральдегид образуются дегидратацией гексоз и пентоз соответственно [66, 67]. Уровень фуранов варьирует в зависимости от типа сырья и процедуры предварительной обработки. В качестве примера концентрации HMF в елистом гидролизате может варьироваться от 2,0 г/л до 5,9 г/л [68]. Обратно, HMF отсутствует в обработанной влажным окислением соломы пшеницы [69]. Фурфурол обычно встречается меньше, чем HMF. Однако он часто остается в

достаточно высоких концентрациях (около 1 г/л) для ингибирования.

Было показано *in vitro*, что фурфурол и HMF непосредственно ингибируют алкогольдегидрогеназу (ADH), пируватдегидрогеназу (PDH) и альдегиддегидрогеназу (ALDH) [70]. Грубые-клеточные экстракты из клеток, выращенных в присутствии фурфурола, также показали снижение активности ADH, гликолитического фермента гексокиназы и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы [71]. Уменьшение фуранов дрожжами может также приводить к истощению NAD(P)H. Данное предположение было высказано в связи с тем, что выделялся увеличеный уровень ацетальдегида, когда был добавлен фурфурол в среду [72]. Кроме того, анализ метаболического потока показал, что фурфурол влияет на гликолитические и ЦТК-путей, которые участвуют в энергетическом метаболизме [73]. Эти соединения индуцируют изменения хроматина, повреждение ДНК, снижение трансляции и инактивацию различных гликолитических ферментов. Кроме того, накопление активных форм кислорода, индуцированных фурфуролом, может повредить митохондрии и вакуоль *S. cerevisiae* [74]. Обе органеллы регулируют окислительно-восстановительный баланс цитозоля, а потеря их функций может привести к снижению уровня потребления глюкозы.

В общем, эффект фуранов можно объяснить перенаправлением энергии дрожжей для устранения повреждений, вызванных фуранами и уменьшенным внутриклеточным АТФ и NAD(P)H, либо путем ферментативного ингибирования или потребления/регенерации кофакторов.

1.1.4.2 Ингибирующие эффекты слабых кислот

Наиболее распространены уксусная, муравьиная и левулиновая слабые кислоты, присутствующие в лигноцеллюлозных гидролизатах. Уксусная кислота образуется путем деацетилирования гемицеллюлоз, тогда как муравьиная и левулиновая кислоты являются продуктами разложения HMF. Муравьиная кислота может дополнительно образоваться из фурфурола в кислых условиях при высоких температурах [66, P. 209; 67, P. 844].

Отмечено ингибирующее действие слабых кислот к разъединению и накоплению внутриклеточного аниона [75]. Недиссоциированная форма слабых кислот может диффундировать из ферментационной среды через плазматическую мембрану [76, 77] и диссоциировать благодаря более высоким внутриклеточным pH, что снижает цитозольный pH [78]. Снижение внутриклеточного pH компенсируется АТФазой плазматической мембраны, которая перекачивает протоны из клетки за счет гидролиза АТФ. Следовательно, меньше АТФ доступно для образования биомассы. Низкий уровень уксусной, левулиновой или муравьиной кислот увеличивает выход этанола, тогда как выход этанола уменьшается при более высоких концентрациях [79].

Было показано, что слабые кислоты ингибируют рост дрожжей путем снижения поглощения ароматических аминокислот из среды, вероятно, как следствием сильного ингибирования TAT2P аминокислотной пермеазы [80].

1.1.4.3 Ингибирующие эффекты фенолов

Производится широкий спектр фенольных соединений во время распада лигнина, а также деградации углеводов при кислотном гидролизе (рисунок 3) [81]. Количество и тип фенольных соединений зависят от источников биомассы, поскольку лигнин в разных сырьевых материалах имеет разную степень метоксилирования, внутреннее связывание и ассоциацию с гемицеллюлозой и целлюлозой в стенке растительной клетки [82].

Фенольные соединения, высвобождаемые при гидролизе лигнина, плохо растворяются в водных растворах, и они могут быть включены в клеточные мембраны и нарушать ее целостность. Здесь фенольные соединения в основном препятствуют функционированию белков и вызывают изменения в отношении белков к липидам [83]. Следовательно, эти соединения влияют на клеточные функции, такие как сортировка (селективный барьер) и сигнализация, а также являются причиной набухания мембраны [84]. Слабокислотные фенольные соединения могут разрушать электрохимический градиент путем переноса протонов назад через митохондриальные мембраны [85]. *S. cerevisiae* может ассимилировать многие из фенолов, которые могут быть частью процесса детоксикации, возникающего во время ферментации [86].

1.1.4.4 Ингибирующие эффекты высоких концентраций этанола

Одним из основных преимуществ *S. cerevisiae* для производства этанола является высокая толерантность, которую эти дрожжи проявляют по отношению к другим микроорганизмам. Высокие концентрации спиртов, таких как этанол и бутанол, нарушают проницаемость клеточной стенки, что приводят к нарушению функций сортировки и сигнализации, а также вызывают увеличение размера клеток, что вызывает задержку клеточного цикла [87]. Этанол также индуцирует появление мелких мутантов без митохондриальной ДНК (мутанты *rho0*) и изменения в митохондриальном геноме [88].

С развитием технологий производста этанола, производственные процессы становятся все более совершенными, что приводит к более высоким выходам этанола и титрам. Например, в США производство этанола кукурузы часто достигает конечной концентрации этанола 16-18%, в то время как бразильский этанол сахарного тростника находится в диапазоне от 8 до 11% [89]. В связи с этим отрасль нуждается в штаммах дрожжей с более высокой максимальной емкостью накопления этанола.

1.1.4.5 Ингибирующие эффекты высокой осмолярности

Осмотический стресс при производстве биоэтанола обусловлен высокими концентрациями сахаров и/или высокими концентрациями солей. При воздействии высокой осмолярности, клетки дрожжей накапливают большое количество глицерина, который служит осмолитом. Осмотический шок нарушает актиновый цитоскелет и появляются инвагинации, влияющие на конформацию пучков актина, которые нарушают каскад MAP-киназы, регулирующий клеточный цикл. Он также способствует оттоку воды из клетки,

увеличивая концентрацию клеточных компонентов, включая концентрации ионов, которые могут служить датчиком для клеточных сигнальных путей [90, 91]. Под осмотическим давлением, выделение этанола и глицерина нарушается, что приводит к накоплению внутриклеточного этанола и уменьшению клеток [92, 93].

В производстве биоэтанола первого поколения присутствие осмотического давления в основном обусловлено концентрированными потоками сахаров (около 35%), которые обеспечивают достижение этанольных титров до 16-18% [94]. В производстве биоэтанола второго поколения трудно достичь высоких концентраций ферментируемых сахаров. Обычно они ограничены, примерно 12% сахаров, так что этаноловый титр составляет всего 5-7%. Следовательно, осмотическое давление, вызванное высокой концентрацией сахаров, обычно не является проблемой при производстве биоэтанола второго поколения. С другой стороны, только часть твердых веществ может быть преобразована в ферментируемые сахара. Для увеличения загрузки твердых частиц требуется дополнительная мощность перекачивания, и надлежащее перемешивание ухудшается, когда вязкость в реакторе слишком высока [95].

1.1.4.6 Ингибирующие эффекты высоких температур

Одним из факторов, который также влияет на эффективность ферментации сахаров в этанол является температура. Она затрагивает все клеточные макромолекулы и метаболические функции. В ответ на повышение температуры, дрожжевые клетки изменяют липидный состав клеточной мембраны. Приращение температуры вызывает увеличение насыщенности и длины жирных кислот и уменьшение их состава в мембранах [96, 97], а также увеличивает синтез длинноцепочечных оснований, которые важны для текучести и динамики мембраны с возможной ролью в регуляции путей передачи сигналов [98, 99].

Оптимальная температура ферментации большинства штаммов *S. cerevisiae* составляет 30-35°C, тогда как оптимальная температура целлюлолитических ферментов составляет 45-55°C [100]. Следовательно, более высокая термотолерантность дрожжей, допускающих температуру ферментации 40°C или выше, будет очень полезна для процесса SSF. В результате количество ферментов, необходимых для гидролиза сахарных полимеров, которое по-прежнему составляет 20-30% от стоимости этанола, может быть значительно уменьшено [101]. Очевидно, что в этом случае более высокая температура гидролиза/ферментации будет в значительной степени способствовать эффективности процесса.

1.2 Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Наиболее известными и коммерчески значимыми дрожжами являются родственные виды и штаммы *Saccharomyces cerevisiae*. Эти организмы уже давно используются для ферментации сахаров риса, пшеницы, ячменя и кукурузы в производстве алкогольных напитков и в хлебопекарной промышленности. Дрожжи *S. cerevisiae* являются, безусловно, самыми идеальными

эукариотическими микроорганизмами для биологических исследований. Полная последовательность их генома оказалась чрезвычайно полезной в качестве ссылки на последовательности генов человека и других высших эукариот. Кроме того, легкость генетических манипуляций дрожжами позволяет использовать их для многих анализов [102].

Некоторые из свойств, которые делают дрожжи, особенно подходящими для биологических исследований, включают быстрый рост, рассеянность клеток, легкость изоляции мутантов, с четко определенной генетической системой и, что самое важное, имеют универсальную систему трансформации ДНК. В отличие от многих других микроорганизмов, *S. cerevisiae* жизнеспособны с множеством маркеров в геноме. Ниже описаны локусы, широко используемые для интеграции генов в геном дрожжей.

1.2.1 Жизненный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Под «жизненным циклом» имеется ввиду наличие двух широких аспектов жизни *S. cerevisiae.* Первый - пролиферация клеток. Процесс, посредством которого клетка одного типа приводит к появлению двух идентичных между собой клеток. Второй аспект связан с изменениями плоидности организма, т.е. переходами в жизненном цикле. Существуют как гаплоидные, так и диплоидные формы: гаплоиды сопряжены с образованием диплоидов, а диплоиды подвергаются мейозу, образуя гаплоиды. Эти процессы, спаривание (которое связано с клеточным слиянием) и мейоз, являются фундаментальными биологическими процессами, и также происходят в многоклеточных организмах. Жизненный цикл *S. cerevisiae* имеет дополнительный аспект вне пролиферации, спаривания и мейоза: гаплоидные дрожжевые клетки могут изменять свой клеточный тип с помощью запрограммированной перегруппировки дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Исследования, проведенные с *S. cerevisiae* объяснили на молекулярном уровне, почему гаплоиды спариваются, но не спорулируются и почему диплоиды спорулируются, но не спариваются.

1.2.1.1 Пролиферация: цикл митотической клетки

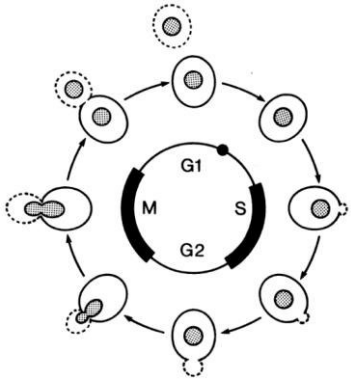
При наличии достаточного количества питательных веществ дрожжевые клетки удваиваются каждые 100 мин или около того. Во время митотического клеточного цикла 17 хромосом гаплоидной клетки дублируются и затем распределяются по каждой клетке. *S. cerevisiae* растет благодаря почкованию, а это означает, что оригинальная «материнская» клетка порождает эллипсоидальную дочернюю клетку, сделанную из совершенно нового клеточного поверхностного материала (рисунок 4) [103].

Это следует противопоставить процессу деления, в котором начальная клетка увеличивается, а затем расщепляются на две дочерние клетки. Дочерняя клетка, образованная *S. cerevisiae*, немного меньше, чем материнская клетка, и должна увеличиться в размере до того, как она начнет дублирование хромосом.

Дрожжевые клетки отказываются от режима пролиферации при

определенных условиях окружающей среды. Например, если у них заканчиваются питательные вещества, они задерживаются в качестве непочкующихся клеток в фазе G1 клеточного цикла (рисунок 4), где они могут выжить и возобновить рост при наличии питательных веществ. На рисунке 4 фазы клеточного цикла нарисованы приблизительно пропорционально их длине и круг внутри G1 указывает на положение, при котором дрожжевые клетки подвергаются задержке с помощью факторов спаривания.

Другое влияние окружающей среды, которое прерывает режим пролиферации, является наличие другой дрожжевой клетки по соседству, с которой возможно спаривание. Если клетки различного типа спаривания находятся рядом друг с другом, партнеры сопряжения временно останавливают клеточный цикл друг друга в фазе G1, а затем подвергаются слиянию клеток. Следующий раздел описывает эти типы клеток и процесс спаривания в некоторых деталях.



Сплошная линия - материнская клетка; пунктирная линия - дочерняя почка и клетка. Затененный материал - ядро клетки. S - синтез ДНК; M - митоз.

Рисунок 4 – Митотический клеточный цикл *S. cerevisiae* [103, P. 537]

1.2.1.2 Переходы: спаривание и споруляция

Хотя *S. cerevisiae* является одноклеточным организмом, он может существовать в любом из трех специализированных типов клеток, которые играют отличительную и важную роль в жизненном цикле (рисунок 5). Все три типа клеток *S. cerevisiae* (a, α и a/α) способны подвергаться митотическому делению клеток (рисунок 4). На рисунке 5 показаны переходы в плоидности, которые происходят в жизненном цикле: спаривание гаплоидов дают диплоиды, а мейоз диплоидов дают гаплоидные клетки. a/α-клетки образуют аск, который содержит четыре гаплоидных продукта (споры), которые являются результатом мейоза диплоидной клетки. Чтобы проанализировать отдельные споры, стенка аска расщеплялась деградирующими ферментами, и отдельные споры были отделены друг от друга микроманипуляцией. Споры начинали расти на питательных средах и образовывали колонии, которые можно было тестировать на их тип спаривания и на другие маркеры. Размеры дрожжевой клетки (эллипсоидальной) составляют приблизительно 4,76 (длинная ось) на 4,19

(короткая ось) мкм для гаплоидов и 6,01 на 5,06, мкм для диплоидов [104]. Таким образом, диплоиды имеют объем, почти вдвое превышающий объем гаплоидов (83% больше).

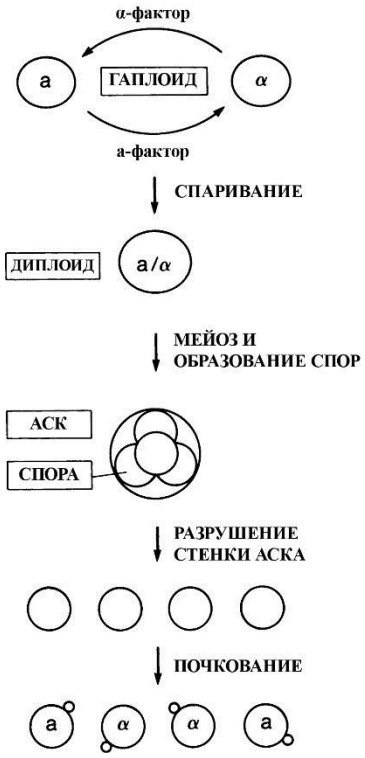


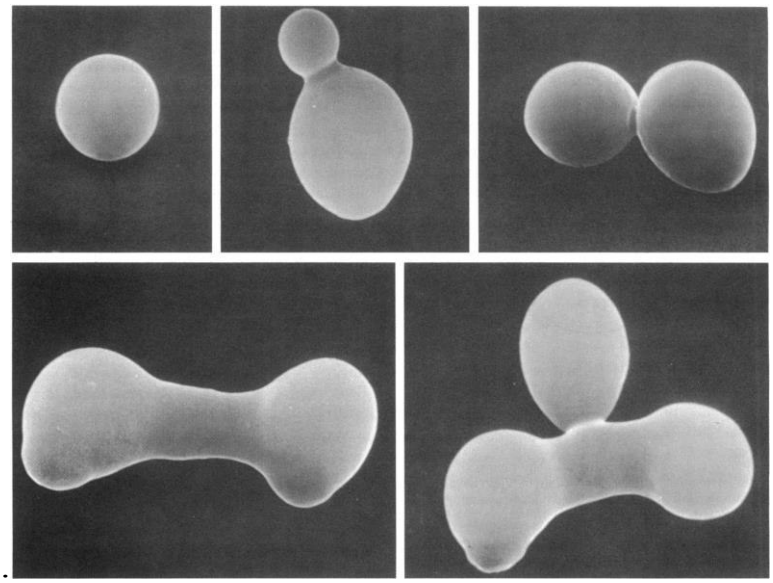
Рисунок 5 – Переходы в жизненном цикле *S. cerevisiae*

Примечание – Составлено автором на основе источника [105]

Двумя специализированными типами клеток являются типы спаривания a и α, которые эффективно взаимодействуют друг с другом почти с 100% эффективностью. Поскольку процесс спаривания приводит к клеточному и ядерному слиянию, спаривание продуцирует диплоидную клетку – зигота (с одним ядром), а не дикарион (клетка с двумя гаплоидными ядрами). Продукт спаривания имеет свою особую форму и порождает дочерние диплоидные клетки обычной формы почкованием (рисунок 6). Диплоидная клетка a/α, образованная спариванием, является третьим специализированным типом клеток: она не может спариваться ни с a-, ни с α-клетками, но она способна подвергаться мейозу. При голодании с питанием это приводит к появлению четырех гаплоидных мейотических потомков, каждый из которых заключен в споровый слой. Все четыре продукта из одного мейоза обернуты вместе в мешочек - аск.

Следует знать, что a- и α-клетки продуцируют специфические сигнальные молекулы и рецепторные системы, которые облегчают процесс спаривания. Клетки каждого гаплоидного типа продуцируют секретируемый пептидный спаривающий фактор, который подготавливает клетки к спариванию. Поскольку эти сигнальные молекулы ответственны за связь между организмами

(*S. cerevisiae* является одноклеточным организмом), а не между клетками внутри многоклеточного организма, эти спаривающие факторы правильно называются феромонами, а не гормонами. А-клетки продуцируют α-фактор [106], пептид из 13 аминокислот, а-клетки продуцируют а-фактор [107], пептид из 12 аминокислот.

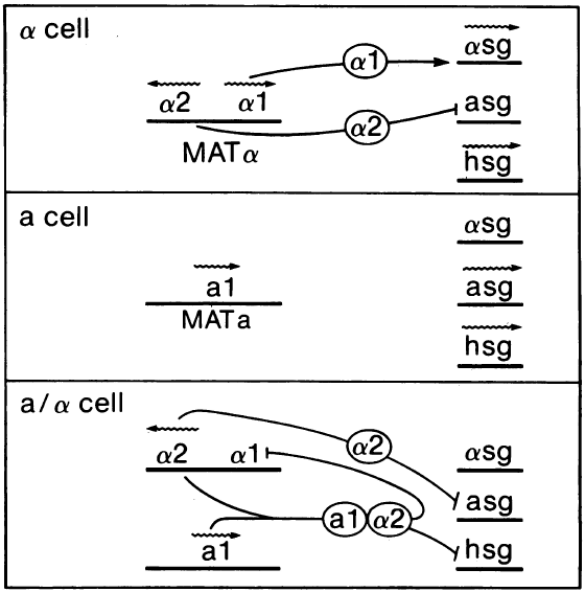


Верхняя строка - непочкующяяся клетка и клетки с почками разных размеров. Нижний левый рисунок – зигота. Нижний правый рисунок – почкующаяся дочерняя клетка а/α типа.

Рисунок 6 – Морфология почкующихся и непочкующихся клеток, и зигот *S. cerevisiae* [103, P. 538]

1.2.1.3 Специализация клеток: явное программирование и экзогенный ответ

а- и α-клетки продуцируют только факторы спаривания и рецепторы, которые им необходимы для спаривания. а/α-клетки не спариваются и не производят ни одной из принадлежностей для спаривания. Различия, проявляемые тремя типами клеток, отражаются в различиях в синтезе рибонуклеиновой кислоты (РНК) из соответствующих генов [108]. Гены, которые транскрибируются в α-клетках, но не в других типах клеток, являются α-специфическими генами (*αsg*), те, которые транскрибируются только в а-клетках, являются а-специфическими генами (*asg*), и те, которые транскрибируются как в а- и α-клетках, но не в клетках а/α, являются гаплоид-специфическими генами (*hsg*). Набор генов, которые активны в разных типах клеток, определяется локусом типа спаривания, который действует как основной регуляторный локус, управляющий клеточной специализацией [109, 110]. Клетки, которые имеют α-аллель в MAT (MATα), демонстрируют фенотип α-клеток; клетки с а-аллелем (MATa) демонстрируют фенотип а-клеток; и клетки с обоими аллелями проявляют фенотип а/α-клеток (рисунок 7).



Слева - локусы типа спаривания; справа - наборы генов, специфичных для клеточного типа. Волнистые стрелки указывают на транскрипцию. Стрелки указывают на стимуляцию экспрессии генов; линии с тупыми концами указывают на ингибирование экспрессии генов.

Рисунок 7 – Контроль экспрессии наборов генов, специфичных для клеточного типа, с помощью регуляторных белков, кодируемых локусом типа спаривания [105, P. 540]

α-клетки. α-клетки продуцируют их соответствующий рецептор и спаривающий фактор, поскольку они содержат активаторный белок, αl, который активирует транскрипцию соответствующих α-специфических генов [111], клетки не продуцируют несоответствующий рецептор и спаривающий фактор, поскольку они содержат репрессорный белок α2, который блокирует транскрипцию соответствующих а-специфических генов [112].

а-клетки. Хотя можно было предположить, что а-клетки будут содержать активаторные и репрессорные белки, аналогичные α клеткам, но они не содержат [113]. а-клетки продуцируют их соответствующий рецептор и спаривающий фактор, поскольку они не обладают а-специфическим репрессорным белком α2 клеток α. Несоответствующий рецептор и спаривающий фактор не продуцируются, потому что в а-клетках отсутствует α-специфический активаторный белок клеток. MATa кодирует два полипептида, al [114], который играет важную роль в а/α-клетках и а2, роль которых неизвестна.

*а/α-клетки***.** а/α-клетки не продуцируют ни тип рецептора, ни тип спаривающего феромона. Продукт α2 играет ключевую роль в придании этих свойств клеткам а/α. Он подавляет синтез продуктов, которые характерны для а-клеток, как это происходит в α-клетках. Кроме того, в сочетании с al-продуктом MATa, он образует регулируемый вид, обозначенный al-α2, который отвечает за многие важные свойства а/α-клеток. Во-первых, al-α2 подавляет синтез αl; следовательно, продукты, характерные для α-клеток, не синтезируются. Во-

вторых, al-α2 репрессирует гаплоидные специфические гены, которые включают гены, необходимые для спаривания (такие как *STE4*, *STE5* и *STE12*) и другие гены. Таким образом, в клетках a/α-клетках синтез специализированных белков в некоторых случаях не происходит, поскольку транскрипция блокируется репрессором, а в других случаях, поскольку регуляторный белок, необходимый для транскрипции, отсутствует. Недавний анализ демонстрирует, что al-α2 связывается с вышерасположенными областями генов, которые он подавляет, в характерных сайтах связывания [115]. Наличие al-α2 обеспечивает сигнал для указания того, что спаривание было успешным. Этот сигнал отключает экспрессию генов для спаривания и включает процесс споруляция. Неспособность a/α-клеток спариваться обусловлено блоком спаривания на нескольких уровнях.

Теперь у нас есть картина того, как три дрожжевые клетки специализируются в отношении одного из важных переходов в жизненном цикле, спаривания.

1.2.1.4 Гомоталлизм и гетероталлизм: Взаимопревращение типов спаривания

Термины гомоталлизм и гетероталлизм используются для обозначения двух разных типов жизненного цикла у грибов. В гомоталлическом жизненном цикле, единичная гаплоидная клетка (в частности, спора) приводит к диплоидному потомству, которое способно подвергаться мейозу. В гетероталлическом жизненном цикле диплоидные потомство образуется только путем спаривания между полученными клетками от отдельных спор, которые имеют противоположные типы спаривания [114, P. 187]. Как такое возможно, что одна (гаплоидная) клетка может давать начало клеткам, которые являются a/α диплоидами? Одна из возможность проявляется в том, что гомоталлический штамм имеет некоторый тип «универсального» типа спаривания, который позволяет любому гаплоиду спариваться с любым другим гаплоидом. В действительности, гомоталлические штаммы дают a/α диплоид путем спаривания между обычно двумя типами спаривания. Гомоталлические гаплоидные штаммы обладают замечательной способностью продуцировать потомство клеткок обоих типов спаривания во время митотических клеточных делений [113, P. 246; 116]. Например, спора, которая есть α, производит некоторое потомство, подобная самой себе, имеющие α-тип спаривания, но а также потомство противоположного типа спаривания! К тому времени, когда клетка разделится три или четыре раз (для образования микроколонии от 8 до 16 клеток), колонии будут содержать как a, так и α. В этот момент a-и α- клетки спариваются для получения дидоидов. Напротив, α-споры, которые гетероталлически растут в колонии, содержат только α-клетки.

Оба гомоталлические и гетероталлические штаммы *S. cerevisiae* были найдены в природе и отличались они друг от друга одним геном, обозначаемым *HO* («гомоталлизм») [117]. Гомоталические штаммы имеют функциональную версию гена *HO*; гетероталлические штаммы имеют дефектную версию гена, *ho*.

(*ho* обычно присутствует в лабораторных штаммах, так что они не смогут переключать типы спаривания и порождать диплоиды a/α).

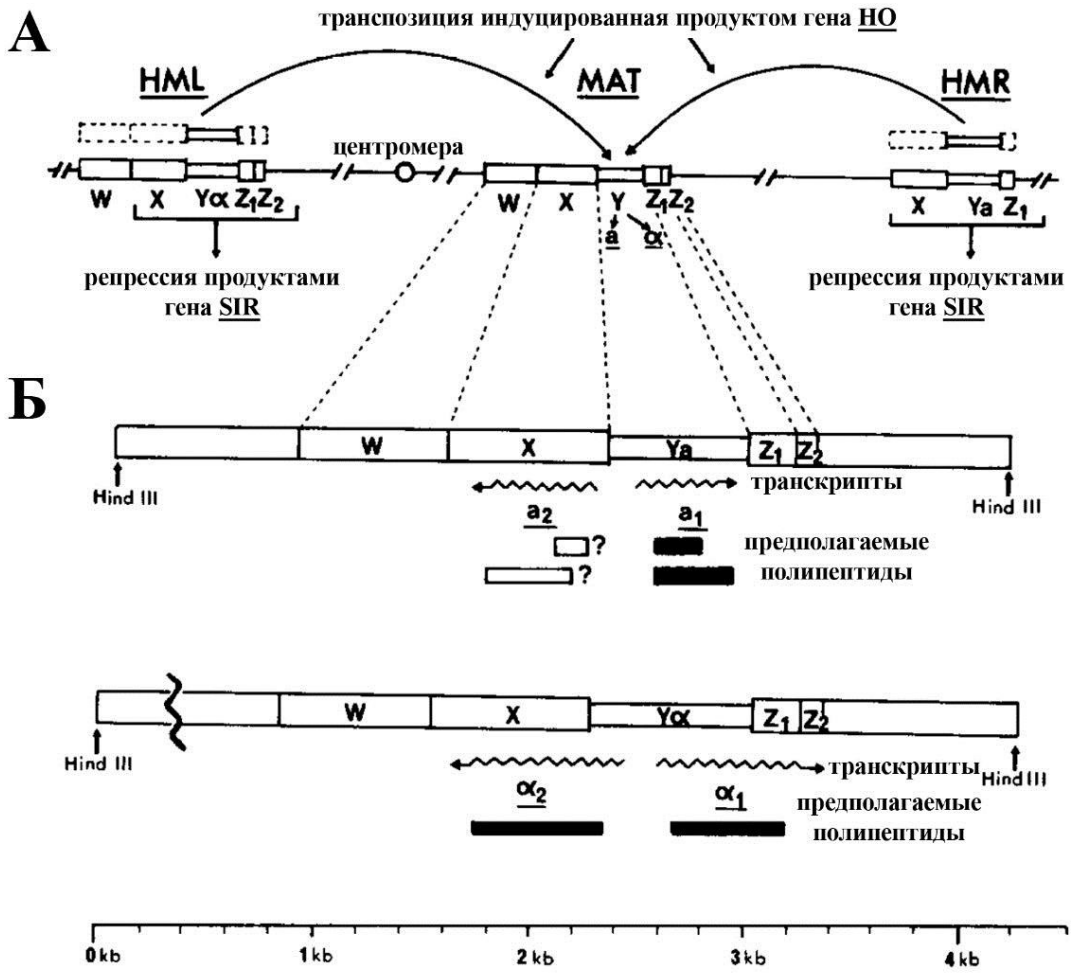
В штаммах *HO* клетки переключаются с одного типа спаривания на другой так же часто, как происходит деление клеток [113, P.246; 118] в то время как в штаммах *ho* клетки переключаются с одного типа спаривания на другой с гораздо низкой частоте, приблизительно 10^{-6} [113, P. 255].

Подробное описание о типах спаривания и гена *HO* представленно в последующих раздела.

1.2.1.4.1 Типы спаривания: *MAT* локус дрожжей *S. cerevisiae*

Для того, чтобы происходило спаривание двух гаплоидных клеток дрожжей *S. cerevisiae*, они должны обладать взаимодополняющими (a или α) типами спаривания. Тип спаривания определяется одним локусом, называемым MAT, на правом плече хромосомы III [104, P. 388]. Гены, которые функционируют в этом локусе, лежат на транспонируемых генетических элементах: a и α кассетах. Они могут поочередно занимать локус MAT, и они также занимают два других локуса на хромосоме III, HML и HMR (рисунок 8). Кассеты в HML (обычно α) и HMR (обычно a) в норме не экспрессируются, находясь под отрицательным контролем продуктов гена несвязанных локусов SIR (MAR, CMT). Кассета в MAT (либо a, либо α) экспрессируется и определяет тип спаривания [119-121]. Таким образом, гаплоидные клетки MATa или MATα, несущие *HO* локус (см. раздел 1.2.1.4.2), приводят к образованию клеток-близнецов с противоположным типом спаривания в результате взаимопревращения типов спаривания, и затем эти клетки соединяются с образованием диплоидных a/α-клеток. Несмотря на то, что гомозиготные по *HO*, полученные клетки MATa/MATα, они остаются диплоидами MATa/MATα, которые могут образовать два a- и два α-гаплоидных спор. Таким образом, конечным продуктом взаимопревращения типов спаривания является стабильный a/α диплоид, полученный из гаплоидов a-или α-клеток [108, P. 3036].

Локусы MATa и MATα имеют длину около 2500 нуклеотидных пар. Каждый из них содержит центральную уникальную последовательность, оцененную как 700 нуклеотидных пар в a и 850 в α. Эти уникальные последовательности ограничены гомологичными последовательностями около 1400 пар нуклеотидов слева и 320 справа. Локус HMLα на левом плече хромосомы III гомологичен по структуре MATα; HMLa и MATa также являются гомологичными. Однако HMRa (и HMRα) на правом плече хромосомы III между MAT и теломерой не содержит около 700 нуклеотидных пар с левого конца и около 90 от правого конца по сравнению с MATa (и MATα). Сегменты кассет обозначены слева направо W, X, Ya, (Yα) Z1 и Z2 и все они присутствуют в HMLa и MATa (и HMLα и MATα). Только X, Ya (Yα) и Zl присутствуют в HMRa (и HMRα) (рисунок 8) [122-125]. На рисунке 8 сплошные линии показывают включения последовательностей, которые определенно были транспонированы, а пунктирные области включают в себя последовательности, которые также могут быть переключены, хотя точные границы не определены.



А) Расположение HML, MAT и HMR на хромосоме III *S. cerevisiae* с указанием местоположения W, X, Ya (Yα) Z1 и Z2 сегментов. Б) Показано выравнивание транскриптов MATa и MATα (волнистые стрелки) с локусами MATa и MATα. Вопрос – функция не обнаруженна; Закрашенная ячейка - положительные полипептиды; Открытые ячейки - возможные полипептиды.

Рисунок 8 – Структура дрожжевого локуса типа спаривания

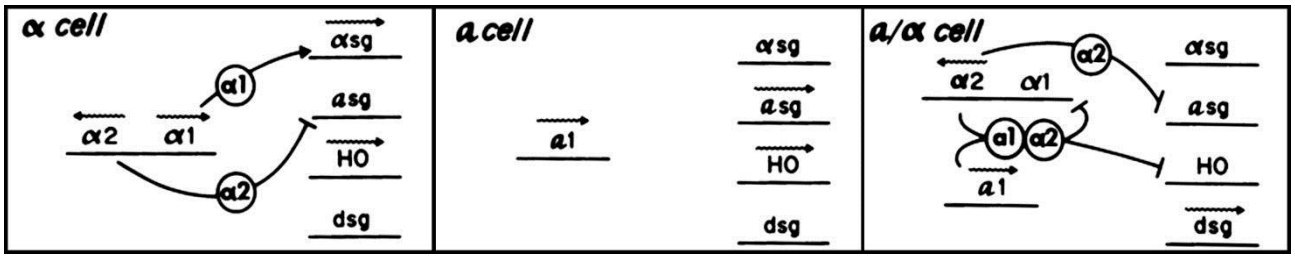
Примечание – Составлено автором на основе источника [126]

1.2.1.4.2 *HO* локус дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

HO локус дрожжей *S. cerevisiae* регулирует частоту взаимопревращений типов спаривания (a или α). Данный локус способствует сайт-специфической, однонаправленной транспозиции кассеты генетической информации из HML и HMR локусов (где кассеты молчат) в локус типа спаривания, где a- или α-кассеты экспрессируются и определяют тип дрожжевых клеток (рисунок 9) [108, P. 3036]. На данном рисунке панели показывают структуру и экспрессию аллелей локуса типа спаривания (MAT) для a-, α- и a/α-клеток согласно гипотезе al-α2 [127].

Как впервые было описано Winge и Roberts [117, P. 341], ген *HO* способствует образованию диплоидных клеток из гаплоидов, процесс, называемый «диплоидизация». Действие *HO* приводит к высокоэффективному

переключению между типами а- и α-клеток. Штаммы, несущие функциональный ген *HO*, демонстрируют двухцепочечный разрыв в локусе типа спаривания, что является важным для инициирования транспозиции. Взаимопревращение типов спаривания контролируется локусом типа спаривания: переключение может происходить в диплоидах MATa/MATa и MATα/MATα, но не в диплоидах MATa/MATα. Таким образом, стабильность MATa/MATα *HO*/*HO* клеток происходит не от диплоидии как таковой, а скорее из-за гетерозиготности в локусе типа спаривания. Более конкретно, ингибирование взаимопревращений типов спаривания в клетках а/α требует функции a1 локуса MATa и функции α2 локуса MATα: *mat*al/MATα и MATa/*mat*α2 диплоиды, несущие *HO*, проявляют взаимопревращение типов спаривания и переключают кассеты в MAT до тех пор, пока геном содержит как MATa, так и MATα. al и α2, конечно же, необходимы для более знакомых свойств а/α-клеток – способности к споруляции и невозможности к спариванию.



Волнистая линия указывает на экспрессию генов; линия со стрелкой указывает на стимуляцию экспрессии генов; линия с перпендикулярной линией на конце указывает на ингибирование экспрессии генов; круговые символы обозначают регуляторные продукты. αsg - α-специфические гены; asg - а-специфические гены; dsg - диплоид-специфические гены.

Рисунок 9 – Контроль типа клеток локусом типа спаривания (гипотеза αl-α2) [108, P. 3036]

Одно объяснение неспособности а/α *HO*/*HO* клеток проявлять взаимопревращение между типами спаривания заключается в том, что *HO* или некоторые другие функции, необходимые для взаимопревращения типов спаривания, не экспрессируются в клетках MATa/MATα. Во-первых, взаимопревращение типов спаривания происходит в клетках а- и α-, а не в а/α - клетках, в которых отсутствует транскрипт *HO*. Это ингибирование требует, как α2-продукта MATα, так и al-продукта MATa [128]. Генетические данные свидетельствуют о том, что локус типа спаривания контролирует экспрессию несвязанных генов (рисунок 10) [129-131].

Таким образом, *HO* представляет собой класс генов, который экспрессируется в гаплоидных клетках (или в диплоидах, гомозиготных по MAT), но не в а/α диплоидных клетках.

1.2.2 Ty элементы

Длинные терминальные повторы Ty элемента, известные как δ-последовательности, являются хорошими мишенями для интеграции посредством гомологичной рекомбинации, так как имеется около 425 копий во всем геноме дрожжей [20, P. 850].

Ty элементы принадлежат к группе ретротранспозонов. Аббревиатура «Ty» означает «Транспозоны дрожжей». Ретротранспозоны и ретровирусы *S. cerevisiae* часто сравниваются из-за сходства между их жизненными циклами и их механизмом интеграции кДНК в геномы клеток-хозяина. Ty элементы генерируют много копий самих себя для вставки в геном клетки-хозяина. Ty последовательность содержит два гена: *tya1* и *tyb1*, которые соответствуют генам *gag* и *pol* генов ретровирусов, соответственно [132].

Ty мРНК транскрибируется и обрабатывается в ядре, а затем переносится в цитоплазму, где она трансформируется в белки GAG и GAG-POL [133]. Ty элементы *S. cerevisiae* производят вирусоподобные частицы (VLP), которые никогда не покидают клетку [134].

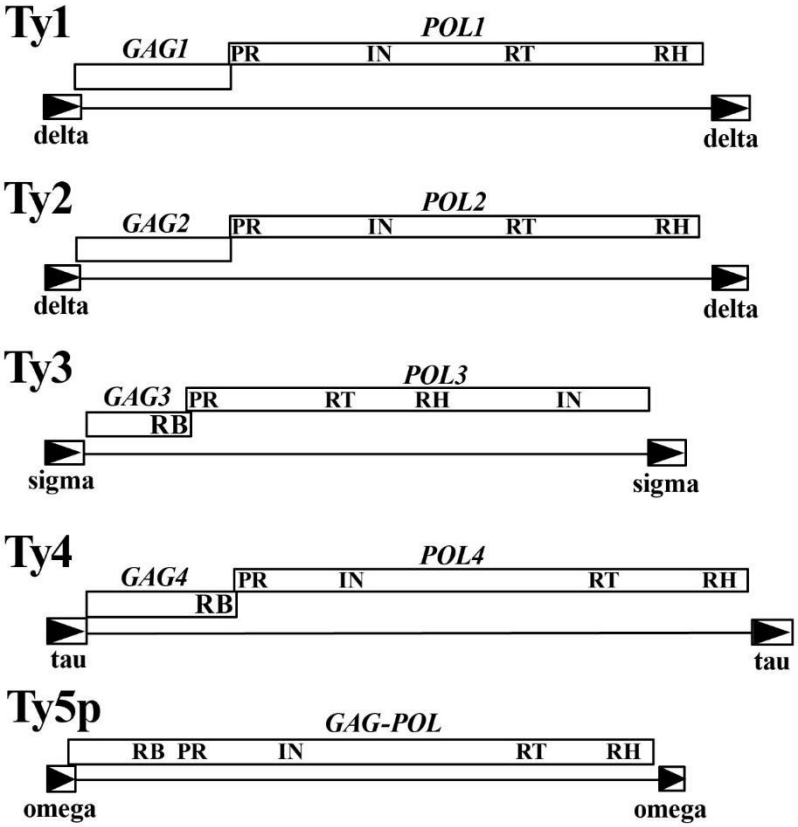
Во время процесса сборки Ty1 РНК упаковывается в VLP и затем обратно-транскрибируется в полноразмерную кДНК. На заключительном этапе транспозиции кДНК интегрируется в новый сайт в геноме хозяина, и цикл может начинаться заново путем транскрибирования вновь транспонированного элемента.

До сих пор известны пять классов элементов Ty: Ty1, Ty2, Ty3, Ty4 и Ty5 [135-137]. Элементы Ty имеют гены «*gag*» и «*pol*» как часть их структуры, но не «env», поэтому они не инфицированы. Наивысшая степень гомологии наблюдается между Ty1 и Ty2. Они построены из фрагмента около 6 kb, называемый *epsilon* (ε), фланкированный с LTR (длинными терминальными повторами) (334 нуклеотидными последовательностями), называемых дельта (δ) [135, C. 6679]. Длина РНК генома составляет 5,6 кб.

Наиболее изученными являются элементы Ty1. Они также являются самыми большими классами ретротранспозон, около 30 копий на гаплоидный геном. Ty1 имеют два рестрикционных сайта *Eco*RI. Их предпочтительными сайтами для вставки являются AT-богатые области в генах секторов промоторов, а также в секторах тРНК-генов. Наименее изученными из них являются ретротранспозоны Ty2, из которых только десять экземпляров на гаплоидный геном. У них есть два сайта рестрикции *BamH*1 (вместо сайтов *Eco*RI Ty1). Элементы Ty3 состоит из фрагмента 5.4 kb, а их LTR известны как сигма (σ) [136, P. 2599]. Есть только четыре копии Ty3 на гаплоидный геном. Элементы Ty4 также плохо изучены. Они состоят из фрагмента 6,3 кб, фланкированного *tau* (τ) LTR. Элементы Ty5 имеют так называемые омега (ω) LTR. Их сайты интеграции находятся в HMR-локусах теломер (рисунок 10) [132, P. 739].

δ-интеграция представляет собой метод интеграции генов экспрессионной кассеты с множественным числом копий в δ-последовательностях Ty ретротранспозон в хромосоме дрожжей. Первоначально метод был разработан для оптимизации активности 3 целлюлаз, отображаемых на поверхности клеток

дрожжей [138].



Консервативные области кодирования в открытой рамке считывания: RB - РНК-связывающий белок, PR - протеиназа, IN - интеграза, RT - обратная транскриптаза, RH-RNAse H.

Рисунок 10 – Организация генома элементов Ty1 в *Saccharomyces cerevisiae*

Примечание – Составлено автором на основе источника [132, P. 740]

1.2.3 Генетические разнообразия промышленных штаммов дрожжей и пути поддержания генетического разнообразия дрожжей

Дрожжи использовались на протяжении тысячелетий для производства ферментированных продуктов и напитков, таких как пиво, вино, сакэ и хлеб. Несмотря на интенсивное использование этих и других дрожжей в биотехнологических применениях и промышленных ферментациях, все еще есть значительные возможности для их улучшения: в промышленных процессах редко используют наиболее подходящий или наиболее эффективный штамм. Это связано с тем, что многие промышленные штаммы в настоящее время используются по историческим причинам, а не тщательно отбираются для конкретного применения, и поэтому часто неоптимальны для своих целей. Кроме того, требования по повышению производительности, более широкого использования субстратов и производства нетрадиционных соединений в

промышленности, а также изменения потребительских предпочтений приводит к большому интересу к дальнейшему улучшению используемых в настоящее время промышленных штаммов, а также к выбору или разработке штаммов с новыми свойствами. А новые применения биотехнологических дрожжей, такие как производство биотоплива второго поколения, сталкивают дрожжи с окружающей средой и проблемами, которые отличаются от тех, которые встречаются при традиционных пищевых ферментациях.

Здесь мы обсуждаем различные стратегии селекции и улучшения штаммом, доступных как для обычных, так и для нетрадиционных дрожжей. Обсуждаются как классические подходы улучшения штаммов, так и более современные методы. Использование существующего природного разнообразия и использование таких методов, как мутагенез, слияние протопластов, селекция, перетасовка генома и направленная эволюция для создания искусственного разнообразия, или использование стратегий генетической модификации для более целенаправленного изменения признаков, привели к селекции превосходных промышленных дрожжей.

1.2.3.1 Происхождение дрожжевого разнообразия

Дрожжи представляют собой очень разнообразную группу организмов, и даже штаммы, которые классифицируются как одни и те же виды, часто демонстрируют высокий уровень генетической дивергенции. Природное разнообразие дрожжей (между видами и даже внутри видов) стало очень ясным с появлением методов секвенирования нового поколения, которые позволяют проводить углубленную характеристику генетической изменчивости [139, 140].

Генетическая изменчивость может быть вызвана несколькими различными процессами, включая половое размножение (где смешиваются и перемешиваются геномы двух родителей), изменения в последовательностях ДНК, такие как точечные мутации (т.е. изменения в отдельных нуклеотидах) и InDels (т.е. событий вставок или делеций относительно коротких фрагментов ДНК), изменения уровня плоидности (когда весь геном или большие его части дублированы или потеряны), транспозоны (мобильные генетические элементы, которые могут вызывать мутации при вставке в геном), генетическая рекомбинация (где части генома реорганизованы, он может воздействовать как на гомологичные, так и негомологичные локусы) или на приобретение экзогенных фрагментов ДНК путем горизонтального переноса генов (HGT). Принимая во внимание, что каждый из описанных выше процессов, как было показано, происходит в природе и, следовательно, вносит вклад в генетическое разнообразие, фенотипический результат и важность каждого из этих процессов трудно оценить, и часто они также зависят от конкретных условий окружающей среды.

Половая рекомбинация является единственным наиболее важным процессом, который генерирует генетическое разнообразие у высших эукариот, таких как животные и растения. Точно так же у дрожжей с половым жизненным циклом, таких как виды *Saccharomyces.* Половое размножение может

переставлять геномы различных штаммов дрожжей, тем самым изменяя их характеристики, и потенциально даже приводить к эволюции новых видов. Хотя половая рекомбинация чаще всего рассматривается как «естественный» процесс, спаривание также происходит между штаммами или видами в промышленных условиях. Примечательным примером является *S. pastorianus*, межвидовой гибрид *S. cerevisiae* и *Saccharomyces eubayanus*, который, возможно, произошел в ферментационном резервуаре лагерных пивоварен [141]. Дополнительное преимущество криотолерантности (типичное для *S. eubayanus*), возможно, привело к их наблюдаемой способности проводить ферментацию лучше при низких температурах, чем только *S. cerevisiae* [142].

Так как дрожжи способны к бесполому размножению, то во время этих бесполых репродуктивных циклов могут возникать спонтанные мутации, такие как точечные мутации, InDels, вставки транспозонов и события рекомбинации. Частота возникновения спонтанных мутаций варьирует в зависимости от генома дрожжей, но, по оценкам, составляет около $3{,}80 \times 10^{-10}$ и $6{,}44 \times 10^{-10}$ / (п.н. × поколение) при измерении в двух специфических локусах, позволяющие фенотипически выявлять мутации [143].

Хотя спонтанные мутации являются одной из основных движущих сил эволюции и позволяют организмам адаптироваться к конкретным экологическим нишам, большинство мутаций являются нейтральными или даже вредными. Большинство видов дрожжей (включая *S. cerevisiae*) обычно существуют на диплоидной стадии, которая может маскировать эффект (гетерозиготных) вредных мутаций. Это может привести к накоплению этих мутаций во время непрерывного бесполого роста, что приводит к штаммам с высокой мутационной нагрузкой. Однако из-за сложного полового жизненного цикла дрожжи могут отфильтровывать эти вредные мутации с помощью процесса, называемого «обновление генома» [144, 145]. По сути, обновление генома приводит к элиминации клеток, несущих вредные рецессивные мутации из популяции, в то же время генерируя гомозиготные диплоидные клетки, в которых эти мутации отсутствуют.

Помимо половой рекомбинации и спонтанных мутаций, перенос генетического материала через бесполые механизмы, называемый горизонтальным переносом генов (HGT), может способствовать генетическому разнообразию. HGT редко встречается у дрожжей, и механизмы, лежащие в основе HGT, еще не выяснены, но были предложены механизмы естественной трансформации и конъюгации [146]. Интересный пример того, как HGT изменяет промышленно значимые фенотипы у дрожжей, описан для широко используемого винного штамма EC1118. Генетический анализ EC1118 показал убедительные доказательства HGT трех областей ДНК, охватывающих 34 гена, участвующих в ключевых функциях брожения вина [147]. Например, FSY1 ген, кодирующий высокоаффинный фруктоза/H^+-симпортер, присутствующий в одном из регионов, может дать значительное преимущество во время процесса ферментации вина, позволяя дрожжам эффективно использовать оставшуюся фруктозу в конце брожение [148]. Интересно, что два из этих регионов были

получены от видов, не относящихся к *Saccharomyces*, и *Zygosaccharomyces bailii*, типичный контаминант винных брожений, был идентифицирован как донор одного региона; указывая на то, что HGT у дрожжей может пересекать границы рода.

Наконец, изменения в уровне плоидности также происходят и могут иметь глубокие фенотипические эффекты. Это лучше всего описано для линии *Saccharomyces*, которая подверглась дупликации целого генома (WGD) около 100 миллионов лет назад. Наиболее важными последствиями этого WGD является то, что дополнительная копия генома позволила глобально перестроить дрожжевую транскрипционную сеть и дала дублированным генам возможность мутировать и приобретать новые или адаптированные функции по сравнению с исходными генами. Кроме того, дупликация отдельных генов до или после WGD, такая как дупликация гена алкогольдегидрогеназы (ADH) около 80 миллионов лет назад, также способствовали успеху видов *Saccharomyces* в ферментации. В случае ADH реконструкция наследственного гена показала, что кодирующий фермент предпочитает превращать ацетальдегид в этанол и поэтому участвует в выработке, а не в потреблении этанола [149]. Спонтанная дупликация этого наследственного гена породила гены, кодирующие ферменты ADH1 и ADH2. Эти современные ферменты демонстрируют другое кинетическое поведение, причем ADH2 связывает этанол сильнее, чем ADH1.

1.2.3.2 Поколение искусственного разнообразия

Несмотря на огромное разнообразие природного дрожжевого разнообразия, чрезвычайно избирательные и специфические условия промышленной ферментации иногда требуют (комбинации) фенотипических признаков, которые могут не встречаться в природе. В то время как физиологическое поведение диких дрожжей предназначено исключительно для выживания и размножения, большинство промышленных ферментаций требуют максимизации процессов и характеристик, которые могут быть не полезны в естественных условиях. Поэтому было разработано несколько методов для искусственного увеличения существующего разнообразия дрожжей и создания вариантов, которые могут работать лучше в промышленных условиях, чем штаммы, выбранные в естественных условиях.

1.2.3.2.1 Прямое спаривание

Прямое спаривание - самый интуитивный способ размножения организмов. Подобно селекции в сельском хозяйстве, она состоит из скрещивания двух тщательно отобранных родителей, обладающих интересным фенотипом. В случае штаммов дрожжей существуют три различных подхода: спаривание от клетки к клетке, спора к клетке и спора к споре. Применимость этих подходов зависит от полового цикла родительских штаммов.

Если оба родительских штамма являются гетероталлическими, может быть проведен предварительный скрининг стабильных вегетативных гаплоидных сегрегантов обоих родителей, после чего могут быть отобраны лучшие

гаплоидные сегреганты для эксперимента по гибридизации. Путем простого смешивания клеточных культур двух отобранных стабильных гаплоидных родителей и последующего скрининга диплоидных клеток можно выделить гибриды. Основное преимущество межклеточной гибридизации заключается в том, что оба гаплоидных родителя могут быть полностью фенотипированы до эксперимента по размножению, что увеличивает вероятность получения улучшенного гибрида. Кроме того, никакого инбридинга не может быть, потому что в одном и том же эксперименте отсутствуют клетки противоположного типа спаривания от одного и того же родительского штамма. Кроме того, один и тот же родитель может много раз использоваться в различных экспериментах по спариванию и теоретически может сохраняться бесконечно долго [150].

Хотя у этого подхода есть некоторые явные преимущества, он не используется регулярно для разработки новых дрожжевых гибридов. Это происходит главным образом из-за гомоталлической природы большинства промышленных и диких штаммов дрожжей, что делает их непригодными для этого подхода. Однако недавно было описано, что некоторые дикие штаммы демонстрируют стабильный тип гаплоидного спаривания благодаря мутации в гене эндонуклеазы HO, гене, ответственном за переключение типов спаривания, что делает эти штаммы подходящими для экспериментов межклеточных спариваний.

Несмотря на то, что прямое спаривание требует больших затрат времени, оно оказалось эффективным способом получения гибридов; спор к споре и спор к клетке регулярно применяются для создания новых, в основном межвидовых гибридов для ферментации. Оно было успешно использовано для получения винных дрожжей с улучшенной криотолерантностью путем скрещивания *S. cerevisiae* с криотолерантными видами, такими как *S. kudriavzevii* или *S. bayanus* [151]. Недавно спаривание между клетками было применено для разработки термотолерантных [152] и устойчивых к множественным стрессам штаммов *S. cerevisiae*. Этот подход также использовался для создания винных, хлебных и пивных дрожжей с оптимальными характеристиками брожения [153].

1.2.3.2.2 Редкое спаривание

Как упомянуто выше, многие природные и промышленные дрожжи демонстрируют низкую эффективность споруляции и/или низкую жизнеспособность спор, затрудняя их использование в экспериментах по прямому спариванию. В этих случаях редкое спаривание может предложить способ получения гибридов. Редкое спаривание основано на редком случае, когда некоторые клетки в диплоидной популяции могут стать гомозиготными по локусу типа спаривания (приводя к a/a или α/α клетке) и впоследствии могут быть спарены с клеткой противоположного типа спаривания. Как правило, в эксперименте по редкому спариванию смешивают плотные клеточные суспензии родительских штаммов, и впоследствии выделяют скрещенные гибриды, используя стадию сильного отбора. Этот отбор часто достигается с использованием респираторно-дефицитного и ауксотрофного родительского

штамма, благодаря чему редкие гибриды легко выбираются по их прототрофии и дыхательной способности [154].

Хотя частоты переключения типов спаривания и последующего спаривания обычно очень низкие, редкое спаривание также использовалось для изучения межвидовых событий гибридизации для улучшения множества дрожжевых признаков. *Saccharomyces cerevisiae* и *S. cerevisiae* (*var. diastaticus*) были скрещены для разработки дрожжей, способных ферментировать декстрины (низкомолекулярные углеводы, образующиеся в результате гидролиза крахмала) с целью производства низкокалорийного пива [155].

1.2.3.2.3 Массовое спаривание и перетасовка генома

Поскольку дрожжи являются такими маленькими организмами с коротким жизненным циклом, можно культивировать миллиарды отдельных клеток и быстро генерировать множество скрещиваний и выполнять последовательные циклы скрещивания. Эти более развитые методы, часто называемые «массовым спариванием» или «перетасовкой генома», могут значительно увеличить пропускную способность и, следовательно, вероятность успеха эксперимента. Массовое спаривание — это метод, в котором большое количество гаплоидных дрожжевых клеток, часто из разных родительских штаммов, смешивается и допускается случайное спаривание. Массовое спаривание является особенно полезным методом улучшения для гомоталлических штаммов, для штаммов, которые показывают низкую эффективность спаривания, или для создания межвидовых гибридов, если имеются сильные селективные маркеры [156].

Массовое спаривание использовалось для создания промышленных штаммов с улучшенными характеристиками. Например, Higgins и его коллеги использовали массовое спаривание и селекцию, чтобы объединить различные свойства двух типов штаммов хлебобулочных изделий, а именно высокую осмотолерантность, которая характерна для штаммов, используемых в сладком тесте, и хорошее использование мальтозы, характерную для штаммов, используемых в несахарных тестах. Во-первых, гаплоидные сегреганты семи промышленных штаммов, использованных в подслащенном тесте, подвергали масс-спариванию с последующим отбором на осмотолерантность, и эту процедуру повторяли несколько раз. Во-вторых, три штамма, использованные для ферментации несахарного теста, были подвергнуты повторным циклам массового спаривания и отбора по росту на мальтозе. На последнем этапе две обогащенные популяции были спорулированы и подвергнуты массовому спариванию, а штаммы, способные к разрыхлению как сладкого, так и несахарного теста, были извлечены после дополнительных раундов массового спаривания и чередующегося отбора на осмотолерантность и рост на мальтозе [157].

Концептуально связанная с массовым спариванием, перетасовка генома является одним из самых последних методов быстрого и относительно легкого улучшения сложных фенотипов у микроорганизмов. В гетерогенной популяции клетка, обладающая определенным фенотипом, может содержать полезные

мутации, которые отличаются от присутствующих в другой, фенотипически сходной клетке в этой популяции. Применяя повторяющиеся циклы генетической рекомбинации (либо путем слияния протопластов, либо путем массового спаривания) и отбора для этой популяции, перетасовка генома направлена на объединение многих из этих различных полезных мутаций в одной и той же клетке, что приводит к аддитивному или синергетическому воздействию на фенотип в стадии изучения [158].

1.2.3.2.4 Слияние протопластов

Хотя обоснование слияния протопластов (часто называемое слиянием сферопластов) очень похоже на половую гибридизацию (они оба стремятся объединить положительные признаки нескольких родителей в одном гибридном штамме), этот метод можно использовать для штаммов, которые не отвечают требованиям для половой гибридизации. Это означает, что этот метод полезен для штаммов, которые не могут спорулировать, давать непостоянные споры, демонстрируют нестабильный тип спаривания, или для штаммов, которые не способны спариваться друг с другом. Таким образом, могут быть получены межвидовые или даже межродовые скрещивания. Поскольку мейоз не требуется, слияние протопластов также можно использовать для увеличения плоидности штаммов, что в некоторых случаях может повысить продуктивность клеток [159].

На практике слияние протопластов обычно состоит из трех основных этапов: деградация клеточной стенки дрожжей (образование протопластов), индукция гибридизации и регенерация клеточной стенки. После гибридизации родительские ядра временно сосуществуют в общей цитоплазме до (потенциально) перехода к кариогамии [160]. Уровень успешности гибридного образования в основном зависит от таксономической близости штаммов и применяемого протокола слияния. Частота внутривидового слияния обычно варьируется от 10^{-3} до 10^{-4}, тогда как для межродовых слияний она может составлять от 10^{-6} до 10^{-7} [161]. Следовательно, разработка оптимальной процедуры селекции гибридов является критически важным шагом для максимизации шансов на достижение желаемой генетической комбинации.

Важным недостатком использования слияния протопластов в качестве стратегии улучшения штамма является то, что многие из гибридов являются митотически нестабильными и часто происходит потеря хромосомы (приводящая к анеуплоидии) или диссоциации на родительские штаммы [161, P. 996]. Далекие родственные виды более склонны демонстрировать этот эффект, чем близкородственные виды. Как правило, эксперименты по слиянию протопластов приводят к гибридам, содержащим полный геном одного родителя с (несколькими) дополнительными хромосомами второго родителя. Как следствие, фенотип и генотип полученного слитого штамма очень трудно предсказать. Соотношение, в котором оба генома присутствуют в гибриде, может быть результатом применяемого протокола слияния или процедуры отбора, используемой для выделения гибридов [160, P. 46]. Кроме того, штаммы,

полученные слиянием протопластов, в некоторых регионах считаются ГМО.

1.2.3.2.5 Мутагенез

Индукция *in vivo* случайных мутаций химическими или физическими мутагенами и последующий отбор фенотипически улучшенных клеток является одним из наиболее широко используемых методов получения оптимизированных микроорганизмов. Одним из наиболее впечатляющих примеров является огромное увеличение производства пенициллина *Penicillium chrysogenum*, которое, по оценкам, составляет более трех порядков, которое было достигнуто в течение 60 лет с использованием процедур множественного мутагенеза [162]. За последние десятилетия мутагенез был применен для улучшения как моногенных, так и полигенных признаков в широком спектре микроорганизмов. Улучшение штамма с использованием мутагенов состоит из двух основных этапов: мутагенеза и скрининга.

Типичный эксперимент по мутагенезу состоит из роста исследуемого штамма в течение ночи с последующей мутагенной обработкой и этапом восстановления. Как тип мутагена, так и дозу следует тщательно выбирать или определять. Однако зачастую трудно предсказать, какой тип генетического изменения необходим для улучшения определенного фенотипа и, следовательно, какой мутаген следует использовать. Поэтому рекомендуется изменить тип мутагена в программе мутагенеза, состоящей из нескольких раундов, чтобы собрать как можно больше различных типов генетических изменений [163].

Не менее важным, чем тип мутагена, являются мутагенная доза и время воздействия. Как правило, очень низкая доза дает низкую долю мутантов, что затрудняет идентификацию улучшенных мутантов. Более того, большинство мутантов могут нести только одну или несколько мутаций, что уменьшает шанс найти улучшения, для которых необходимы комбинации различных мутаций. С другой стороны, высокая доза порождает мутантов, которые несут множественные мутации, многие из которых могут быть вредными, приводя к большой доле инфекционных или даже нежизнеспособных клеток. Следовательно, оптимальной дозой является та, которая дает наибольшую долю полезных мутантов из всех клеток, которым удается выжить; что-то, что в значительной степени зависит от природы фенотипа. Простые фенотипы, которые зависят от одной или нескольких мутаций, такие как ауксотрофия, обычно показывают монотонную кривую доза-ответ, означающую, что доля желаемых мутантов на одного выжившего увеличивается с увеличением дозы и достигает насыщения в некоторой точке, после чего число превосходящие мутанты могут снова уменьшиться из-за увеличивающейся доли клеток с вредными мутациями. Для сложных фенотипов, таких как производство соединения/метаболита в высокой концентрации, на которые влияют многие различные гены, идеальную дозу и кривую доза-ответ сложнее предсказать. Хотя высокая доза обычно приводит к быстрому фенотипическому улучшению, исследователи обычно предпочитают использовать низкую дозу. Таким образом, они избегают накопления вредных мутаций и увеличивают частоту мутаций

только тогда, когда низкие показатели убийства не дают улучшенных мутантов [164].

В недавних исследованиях мутагенез часто является первым шагом для генерации генетической изменчивости в популяции, после чего применяется перетасовка генома наиболее эффективных мутантов для объединения множества полезных мутаций в одной и той же клетке, или мутантная популяция подвергается прямой направленой эволюции. Альтернативно, штаммы, полученные путем генетической модификации или селекции, также могут быть дополнительно улучшены с использованием случайного мутагенеза. Например, Kumari & Pramanik (2012) подвергли гибрид между *S. cerevisiae* и *Pachysolen tannophilus* нескольким циклам мутагенеза, чтобы повысить его устойчивость к высоким температурам, этанолу и токсичным соединениям [165].

1.2.3.2.6 Направленная эволюция

Улучшение штамма путем эволюционной инженерии, термин, впервые введенный Butler et al. (1996) и позже также часто упоминается как адаптивная, направленная или экспериментальная эволюция, опирающаяся на базовые принципы (естественного и/или индуцированного) генетического изменения и последующего отбора, действующего на это изменение [166]. Как правило, популяция клеток выращивается при непрерывном отборе для интересующего фенотипа для многих поколений (деления клеток). Со временем в этой популяции появятся случайные мутанты. Направленная эволюция может также сочетаться с использованием мутагенов и/или половой гибридизации в развивающихся популяциях для увеличения генетической и фенотипической изменчивости, на которую может воздействовать отбор. Если определенная мутация (или мутации) наделяет клетку преимуществом пригодности, этот вариант будет выбран и обогащен в популяции. Из-за короткого времени генерации и легкой манипуляции и культивирования микроорганизмов в лаборатории эволюционная инженерия является возможным путем для создания штаммов дрожжей с улучшенными фенотипами относительно быстрым способом [167].

Направленная эволюция оказалась ценным инструментом для создания штаммов дрожжей с особыми, улучшенными характеристиками. В нескольких исследованиях было исследовано, как дрожжевые клетки адаптируются к определенным ограничениям питательных веществ, например, ограничениям по глюкозе, фосфату или сульфату [168, 169]. Поскольку основное внимание в этих исследованиях было уделено определению точных генетических основ того, как клетки адаптируются к конкретному стрессу, а также насколько воспроизводимой была адаптация, это исследование было выполнено со стандартными лабораторными штаммами дрожжей, которые имеют лишь ограниченную промышленную значимость. Тем не менее, еще несколько прикладных исследований начались со штаммов, обычно используемых в виноделии, пиве, биотопливе и хлебопекарной промышленности. Целевые фенотипы включают устойчивость к отдельным стрессам, таким как высокий

уровень ацетата или этанола, осмотический стресс, а также высокие концентрации ионов металлов, таких как медь и кобальт, а также (улучшенное) использование альтернативных источников углерода, таких как ксилоза и арабиноза. Однако в промышленных условиях клетки часто сталкиваются с комбинацией различных стрессов: например, во время пивоваренной ферментации клетки сталкиваются с осмотическим стрессом, высоким уровнем этанола и лишением питательных веществ. Выполняя этапы отбора в условиях, напоминающих эту суровую среду, исследователям удалось выделить устойчивые к множественным стрессам лагерные штаммы с улучшенной способностью к ферментации у высокогравитационного сусла [170].

Направленная эволюция может также использоваться для дальнейшей оптимизации характеристик (промышленных) штаммов дрожжей, полученных с помощью других методов, таких как метаболическая инженерия или перетасовка генома. Появление новых технологий секвенирования теперь также позволило упорядочить полные геномы эволюционирующих штаммов.

1.3 Целлюлазы и их роли в целлюлозном гидролизе

Целлюлазы – это ферменты, которые гидролизуют β-1,4-связи в цепях целлюлозы. Они производятся грибами, бактериями, простейшими, растениями и животными. Каталитические модули целлюлаз были отнесены к многочисленным семействам на основе их аминокислотных последовательностей и кристаллических структур [171]. Исследования целлюлитических ферментов начались еще в 1950-х годах в результате их выгодной способности превращать лигноцеллюлозу в глюкозу и другие растворимые сахара [9]. В промышленных целях наиболее часто изучаемые целлюлолитические организмы относятся к грибковым видам: *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* и *Aspergillus* из-за их способности производить ферменты внеклеточно и в больших количествах, как было рассмотрено Gautam et al. [172].

В природе полный гидролиз целлюлозы опосредуется комбинацией трех основных типов целлюлаз: (I) эндоглюканазы (эндо-1,4-β-глюканазы, EC 3.2.1.4) (EGs), (II) экзоглюканазы, (экзо-1,4-β-глюканазы, EC 3.2.1.91) и (III) β-глюкозидазы (1,4,-β-глюкозидазы, EC 3.2.1.21) (BGs) [173]. Эндоглюканазы предпочтительно гидролизуют аморфные (внутренние) области фибрилл произвольно путем расщепления β-глюкозидных связей; целлобиогидролазы представляют собой экзоглюканазы, высвобождающие целлобиозу, из концов цепей. Экзоглюканазы нарушают кристаллическую структуру целлюлозы и поэтому являются ключевыми для процесса конверсии биомассы [174]. На последнем этапе β-глюкозидазы завершают процесс деградации путем гидролиза целлобиозы и других целодекстринов с низкой степенью полимеризации до единиц глюкозы (рисунок 11). Целлобиоза, состоящая из двух молекул глюкозы, связанных β-1,4-гликозидными связями, является ингибитором EG и CBH, поэтому BGL снижает ингибирование путем расщепления целлобиозы и продуцирования молекул глюкозы [175].

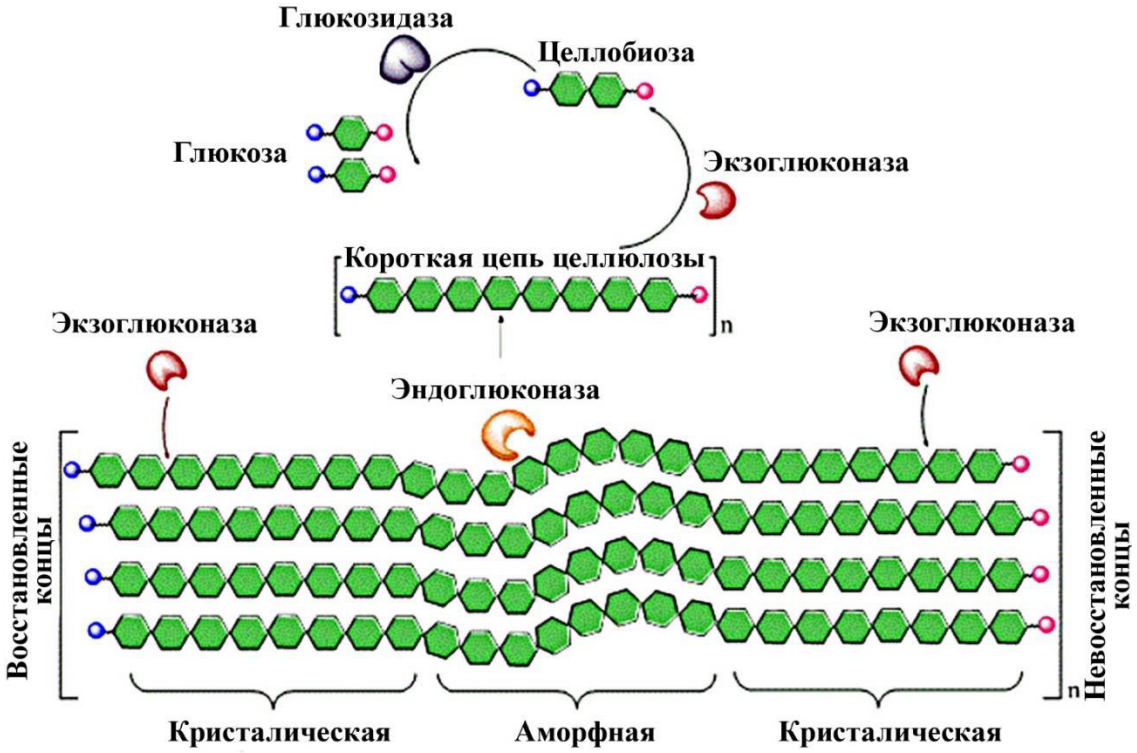


Рисунок 11 – Схематическое представление ферментативного гидролиза кристаллической целлюлозы синергическим действием целлюлаз

Примечание – Составлено автором на основе источника [176]

Структурно грибковые целлюлазы представляют собой простой и модульный фермент с функционально отличными модулями или доменами [177]. Некоторые из них обладают двумя доменами, каталитическими доменами (CD) и углевод связывающими доменами (CBM), состоящие из приблизительно 35 аминокислот, связанными богатым серин-треониновым полилинкером с различной длиной и структурой цепи (рисунок 12) [178]. Углевод связывающие модули имеют размер от 4 до 20 кДа и богаты ароматическими и часто полярными аминокислотными остатками, которые обездвиживают субстрат во время катализа. Активный сайт каталитического домена может быть топологически туннельным, щелевидным или карманным по форме, что позволяет эффективно гидролизировать субстрат [179].

Все три ключевых типа ферментов имеют аналогичные каталитические домены, которые расщепляют β-гликозидную связь между молекулами глюкозы, но отличаются связывающими к ним субстратами и взаимодействующими с субстратом доменами, которые действуют, чтобы привязать ферменты к их полимерному субстрату и позволить процессуальную деградацию целлюлозы путем сканирования по ее нити [180].

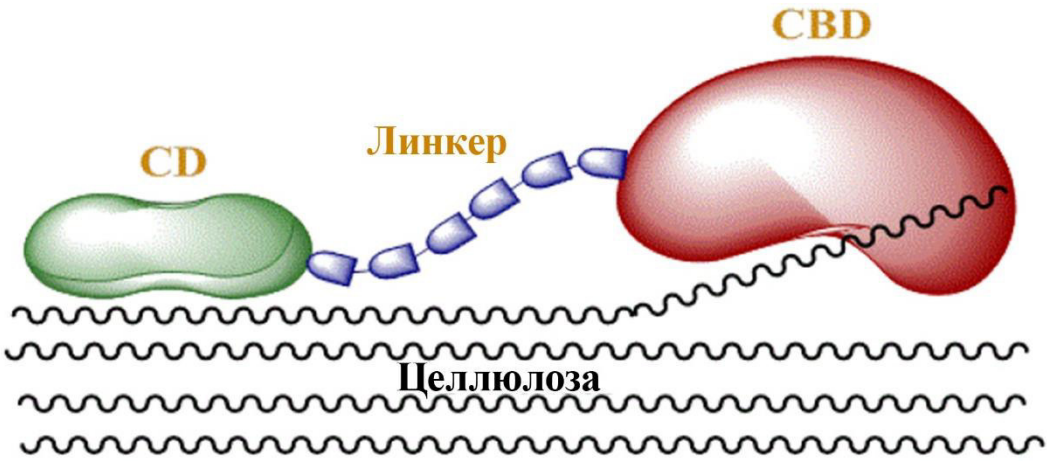


Рисунок 12 – Общая структура целлюлазы, состоящей из каталитического домена (CD) и углеводного связывающего домена (CBD), присоединенного через линкерный пептид

Примечание – Составлено автором на основе источника [178, С. 1326]

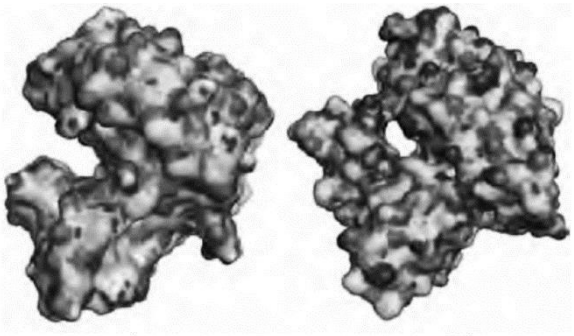
1.3.1 Эндоглюканазы

Эндоглюканаза или CMCase, случайным образом разрезают β-1,4-цепи целлюлозных цепей, генерируя новые концы. Грибковые эндоглюканазы обычно имеют каталитический модуль с CBM или без него, тогда как бактериальные эндоглюканазы могут иметь несколько каталитических модулей, CBM и другие модули с неизвестной функцией. Каталитические модули большинства эндоглюканаз имеют активный центр в форме щели, как представленно на примере эндоглюканазы Cel6A *Thermobifida fusca* (рисунок 13А), что позволяет эндоглюканазам связываться и расщеплять целлюлозную цепь с образованием глюкозы, растворимых целлодекстринов или нерастворимого фрагмента целлюлозы. Однако некоторые эндоглюканазы могут действовать «процессивно» на основе их способности гидролизовать кристаллическую целлюлозу и генерировать основные продукты в виде целлобиозы или более длинных целлодекстринов [181-186].

1.3.2 Экзоглюканазы

CBH (целлобиогидролаза) является наиболее изученной экзоглюканазой. Экзоглюканазы действуют процессивно на восстанавливающие или невосстанавливающие (то есть со свободной гидроксильной группой при C-4) концы целлюлозных полисахаридных цепей, высвобождая целлобиозу или глюкозу в качестве основных продуктов. Экзоглюканазы могут эффективно воздействовать на микрокристаллическую целлюлозу, предположительно отшелушивая целлюлозные цепи из микрокристаллической структуры [187]. Наиболее значимой топологической особенностью каталитического модуля CBH является туннельная структура, как представленно на примере экзоглюканазы Cel6A *Humicola insolens* (рисунок 13Б). Туннель может покрывать всю (например, семейство 7 CBH) или часть активного сайта

(например, семейство 48 CBH). Именно туннелеподобная форма активного сайта экзоглюканазы позволяет ферменту гидролизовать целлюлозу уникальным «процессуальным» способом [188, 189].



А) Структура эндоглюканазы Cel6A *Thermobifida fusca* (код PDB: 1TML), которая показывает глубокую расщелину на активном участке. Б) Структура экзоглюканазы Cel6A *Humicola insolens* (код PDB: 1BVW), в которой активный сайт имеет расширенную петлю, которая образует туннель.

Рисунок 13 – Кристаллические структуры семейства 6 эндоглюканазы и экзоглюканазы [190]

1.3.3 β-глюкозидазы

β-глюкозидазы (BGs), которые не содержат CBM гидролизуют растворимые целлодекстрины и целлобиозу, которая является известным ингибитором CBH и эндоглюканазы, путем отщепления целлобиозы и удаления глюкозы из невосстанавливающего конца олигосахаридов. BG имеют карманно-подобный активный сайт, который позволяет им связывать нередуцирующую глюкозу и отсоединять глюкозу с целлобиозы или целлодекстрина. Активность BG на нерастворимой целлюлозе незначительна. Фермент также гидролизует алкильные и арил-глюкозиды [191].

1.4 Мембранный переносчик целлодекстринов гриба *Neurospora crassa*

Было показано, что нитчатый гриб, *N. crassa*, способен деполимеризовать и метаболизировать растительные клеточные стенки. При выращивании данного гриба на растительных клеточных стенках или чистой целлюлозе, *N. crassa* активировал перекрывающийся набор из 114 генов, где 10 из них являлись главными посредниками суперсемейства транспортеров [192]. Далее были идентифицированы два переносчика целлодекстринов (CDT-1 и CDT-2) в *N. Crassa*, и только они были способны переносить целлодекстрины. Heejin Kim и др. [193] показали, что CDT-1 является более эффективным переносчиком для инженерных путей использования целлобиозы, чем CDT-2 для инженерии *S. cerevisiae* с целью ферментации целлобиозы. Однако переносчик целлодекстрина 2 (CDT2) из того же вида является посредником и имеет потенциал быть более эффективным, чем CDT1 в анаэробных условиях из-за его

энергетических преимуществ. В настоящее время CDT2 обладает очень низкой активностью и считается ограниченным по скорости во время ферментации целлобиозы, в связи с этим в основном используется CDT-1 (рисунок 14).

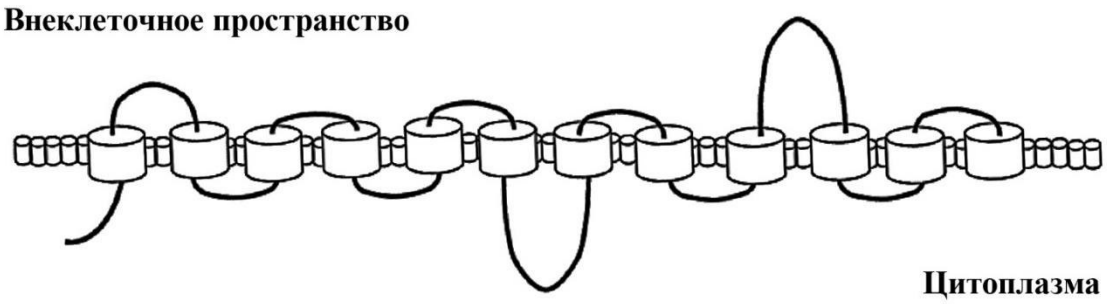


Рисунок 14 – Структура переносчика целлодекстрина 1 (CDT-1)

Примечание – Составлено автором на основе источника [194]

Поскольку целлобиоза не катаболизируется дрожжами *S. cerevisiae* [195] и не накапливается в цитоплазме, было предложенно, что экспрессия функциональной транспортной системы переносчика целлодекстрина из *N. crassa* может позволить *S. cerevisiae* расти с целлобиозой в качестве единственного источника углерода. Прямая ферментация целлодекстринов вместо глюкозы является выгодным, поскольку глюкоза ингибирует активность целлюлаз и чтобы преодолеть ингибирование обратной связи целлюлаз целлобиозой и уменьшить высокую стоимость ферментов, было предложено сконструировать дрожжи *S. cerevisiae* для ферментации целлобиозы непосредственно через введение двух гетерологичных генов, которые позволят переносить целлобиозу (и целлодекстрины) и производить внутриклеточный гидролиз целлобиозы (и целлодекстринов) до глюкозы.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Объект исследования. Промышленные штаммы дрожжей *S. cerevisiae* ATCC 24860, YB-2625, Y-1528 и Y-2034.

Клеточные линии. В ходе работы мы использовали бактериальные штаммы JM109 (Promega) для наработки плазмидной ДНК и Rosseta 2(DE3) (Novagen) для экспрессии белков, а так же дрожжевой экспрессионный штамм FF18733. Соответствующие генотипы всех штаммов бактерий и дрожжей, использованные в этой работе, приведены в таблице 2.

Клетки *E. coli* культивировали в полноценной среде LB (5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л триптона, 10 г/л NaCl) при 37°C на шейкере с 250 об/мин, при необходимости добавляли ампициллин (100 мкг/мл) или канамицин (50 мкг/мл).

Дрожжевые штаммы *S. cerevisiae* культивировали в богатой среде YP (10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона) с 20 г/л глюкозы (YPD) или 20 г/л целлобиозы (YPC). YPC среда с 2% целлобиозой была использована для ферментационного анализа и скрининга на чашках. Штаммы *S. cerevisiae* культивировали при 30°C на шейкере при 250 об/мин для аэробного роста или 100 об/мин для анаэробных условий культивирования в закрытых колбах. Все дрожжевые трансформанты отбирались на чашках с YPD агар, дополненные по необходимости дисульфитом G418 (100 мкг/мл) или флеомицином (10 мкг/мл). Все штаммы хранились при – 80°C в стандартной среде для хранения на основе 15% глицерина.

Таблица 2 – Генотипы и источники изоляции бактериальных и дрожжевых штаммов использованных в ходе работы

Штамм	Генотип/Источник изоляции	Источник
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk–, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F´ traD36, proAB, laqIqZΔM15]	Promega
Rosetta 2(DE3)	F- ompT $hsdS_B(r_B- m_B-)$ gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R)	Novagen
FF18733	*MAT*a *his7-2 leu2-3,112 lys1-1 trp1-289 ura3-52*	Stratagene
FF18733/YEGAp-*eng1*	FF18733 YEp::(TRP; pGAPDH-*eng1*-tGAPDH)	[196]
FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*	FF18733 hoΔ::(KanMX4; pGAPDH-*eng1*-tGAPDH)	[196]
ATCC 24860	641a [VTT C-79096]	ATCC*
YB-2625	*S. cerevisiae* изолированный из жома	ARS**
Y-1528	*S. cerevisiae*, природный галактозо-ассимилирующий изолят	ARS

Продолжение таблицы 2

Y-2034	*S. cerevisiae* изолированный из вина	ARS
ATCC 24860/TaBgl1	ATCC 24860 hoΔ::(KanMX4; pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH)	В этой работе
YB-2625/TaBgl1	YB-2625 hoΔ::(KanMX4; pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH)	В этой работе
Y-1528/TaBgl1	Y-1528 hoΔ::(KanMX4; pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH)	В этой работе
Y-2034/TaBgl1	Y-2034 hoΔ::(KanMX4; pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH)	В этой работе
Y-2034/*tabgl1-cdt1*•*egfp*	Y-2034 hoΔ::(Ble; pTEF1-3xflag-*tabgl1*-tADH1-pPGK-*cdt1-eGFP*-tCYC)	В этой работе
Y-2034/TaBgl1/ *eng1-cel6B-cel7A*	Y-2034 hoΔ::(KanMX4; pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH), (δ-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH, pGAPDH- α-*cel6B*-tGAPDH, pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH-δ)	В этой работе
Примечания * Штаммы были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC); ** Штаммы были получены из коллекции культур ARS в Национальном центре исследования по использованию сельскохозяйственных культур, Пеория, Иллинойс.		

Плазмиды и вектора. В данной работе были использованы вектора и плазмиды представленные в таблице 3. Интегральный вектор *pHO*-poly-KanMX4-*HO* – был любезно предоставлен профессором David J. Stillman (университет Юты, США) [197], конститутивный вектор YEGAp/*eng1* - профессором Hidehiko Kumagai (Киотский университет, Япония) [198].

Таблица 3 – Плазмиды и вектора использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
YEGAp/*eng1*	Эписомальный вектор, pGAPDH, tGAPDH, ген *eng1*	[198, С. 438]
pHO-poly-KanMX4-*HO*	Интегральный вектор, KanMX4	[197, С. 2]
pHO-KanMX4-GAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*	Экспрессионный вектор, KanMX4, pGAPDH, tGAPDH, ген *eng1*	[196, С. 6443]
pET28c	Индуцибельный *lac*-промотор бактериофага T7, 6xHis-tag на С-конце	Clontech
pET28c/*bgl1*	Индуцибельный *lac*-промотор бактериофага T7; 6xHis-tag на С-конце, ген *bgl1*	В этой работе

Продолжение таблицы 3

pET28c/*cdt1*	Индуцибельный lac-промотор бактериофага T7; 6xHis-tag на C-конце, ген *cdt1*	В этой работе
pMETαB	Сигнальный пептид (α-фактор)	Invitrogen
pBluescript IISK-*tabgl1*-flag	Ген *bgl1*, 1xflag эпитоп	В этой работе
p*HO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO*	Интегральный вектор, KanMX4, сигнальный пептид (α-фактор), pGAPDH, tGAPDH, ген *tabgl1*, 1xflag эпитоп	В этой работе, [199]
pBSK-3xflag-c-MYC-HA-MCS	3xFlag, c-MYC, HA эпитопы, сайт множественного клонирования	В этой работе
pBSK-3xflag-*tabgl1*	3xFlag эпитоп, ген tabgl1	В этой работе
pCEV-G1-Ph	pTEF1 и pPGK1, ген резистентности *Sh ble*	В этой работе
pCEV-G1-Ph/3xflag-*tabgl1*	pTEF1 и pPGK1, ген резистентности *Sh ble*, ген *tabgl1*	В этой работе
pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*bgl1*•*cdt1*	pTEF1 и pPGK1, ген резистентности *Sh ble*, ген *tabgl1*, ген *cdt1*	В этой работе
pEGFP-C3	ген *egfp*	В этой работе
pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1*•*cdt1*-*egfp*	pTEF1 и pPGK1, ген резистентности *Sh ble*, ген *tabgl1*, ген *cdt1*, ген *egfp*	В этой работе
p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-cdt1-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO*	Интегральный вектор, pTEF1, tADH1, pPGK1, tCYC1, ген резистентности *Sh ble*, ген *tabgl1*, ген *cdt1*, ген *egfp*	В этой работе
pBluescript II SK-δ-MCS-δ	5’ и 3’-δ-последовательности для интеграции в δ-последовательности	В этой работе
δ-pTEF-*ble*-tTEF-δ	5’ и 3’-δ-последовательности, ген резистентности *Sh ble*	В этой работе
δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-δ	5’ и 3’-δ-последовательности, ген резистентности *Sh ble*, pGAPDH, tGAPDH, ген *eng1*	В этой работе
pET11d/α-*cel7A*	сигнальный пептид (α-фактор), ген *cel7a*	[200]
pET11d /α-*cel6B*	сигнальный пептид (α-фактор), ген *cel6b*	[200]
YEGAp/α-*cel7A*	Эписомальный вектор, сигнальный пептид (α-фактор), ген *cel7a*	В этой работе

Продолжение таблицы 3

YEGAp/α-*cel6B*	Эписомальный вектор, сигнальный пептид (α-фактор), ген *cel6b*	В этой работе
δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH-δ	Интегральный вектор, 5' и 3'-δ-последовательности, ген резистентности *Sh ble,* pGAPDH, tGAPDH, ген *eng1,* ген *cel6b,* ген *cel7a,* сигнальный пептид (α-фактор)	В этой работе

Ферменты и реактивы. В ходе работы используемые буферные растворы готовились из различных реактивов марок х.ч., ч.д.а., и ос.ч., производимых фирмами «Sigma», «Amresco», «NeoFroxx» и «Applichem». Также были использованы ферменты модификаций ДНК и белков производимых фирмами «Sigma-Aldrich» (Германия), «New England Biolabs» (Франция), «Thermo Fisher Scientific» (USA), «Roche» (США) и «Promega» (США).

2.2 Выделение нуклеиновых кислот из мицелиев грибов

100 мг мицелиев грибов растирали в фарфоровой ступке в присутствии жидкого азота (-196ºС), добавляли 1мл буфера для экстракции (100 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 25 мМ EDTA, 2 М NaCl, 0,2% β-меркаптоэтанол, 0.2% pVp_{40000}) и гомогенизировали. Гомогенизированную суспензию переносили в микропробирки и инкубировали на водяной бане при 65ºС в течение 10 минут. Добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и инкубировали на льду в течении 15 минут. Центрифугировали со скоростью 12000 об/мин при 4ºС, 10 минут. Отбирали водную фазу и проводили экстракцию 2,5 объемом охлажденного изопропанола (-20ºС). 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 НК подсушивали под вакуумом и растворяли в 100 мкл dH_2O. Измерение концентрации нуклеиновых кислот проводили в спектрофотометре «UltroSpec» при длине волны 260 нм [200, С. 42].

Дополнительную очистку РНК из тотального препарата нуклеиновых кислот проводили осаждением 3 М LiCl. Осадок собирали центрифугированием при 15000 об/мин при 4ºС в течение 30 мин. Супернатант сливали и осадок растворяли в 100 мкл dH_2O и осаждали 2,5 объемами этанола при -70°С. Осадок дважды промывали 70% спиртом, высушивали и растворяли в 50 мкл dH_2O. Качество выделенной тотальной РНК проверяли методом электрофореза в 0,8% агарозном геле в трис-боратной (ТВЕ) буферной системе. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете [200, С. 42].

2.3 Выделение мРНК

Выделение мРНК проводили путем обогащение мРНК на олиго-dT

целлюлозе.

Приготовление целлюлозы: Олиго-dT целлюлозу помещали в буфер для элюции (10 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1 мМ EDTA, 0.05% SDS) из расчета 40 мг олиго-dT целлюлозы на 1 мг тотальной РНК. Дали ей увеличиться в объеме (набухнуть), промыли четыре раза тем же буфером (центрифугировали на максимальной скорости 30 сек в промежутках между промывками) и 2-3 раза однократным связывающим буфером (2X – 1 M NaCl, 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 2 мМ EDTA, 0.1% SDS).

Выделение мРНК: Объем препарата тотальной РНК довели до 600 мкл с добавлением dH_2O. Препарат инкубировали в течении 5 мин при 65°C, добавляли 600 мкл 2X связывающего буфера. Полученную смесь переносили в пробирку с промытой олиго-dT целлюлозой и инкубировали 15 мин при комнатной температуре на качалке. Смесь центрифугировали при 14000 об/мин, удаляли супернатант. Осадок промывали два раза однократным связывающим буфером и два раза промывочным буфером (0,2 M NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1 мМ EDTA, 0.05% ДСН). МРНК элюировали с олиго-dT целлюлозы добавлением 250 мкл буфера для элюции и инкубированием при 37°C в течении 5 мин. Далее смесь центрифугировали и осторожно отбирали супернатант в чистую пробирку. Повторяли элюцию. Объединяли элюаты и доводили объем водой до 200 мкл. Для осаждения поли-А РНК к раствору добавляли 40 мкл 5 М ацетата аммония, 2,5 объема этанола, и помещали на 30 мин в морозильник на -70°C, или на ночь на -20°C. Осадок собирали центифугированием и растворяли в 50 мкл dH_2O [200, С. 43].

2.4 Реакция обратной транскрипции (ОТ)

Для синтеза кДНК в стерильную пробирку добавляли (в указанной последовательности): РНК (0,01-5 мкг тотальной РНК или 1-500 нг поли-А РНК), праймер (15-20 пмоль ген-специфичного праймера), стерильной dH_2O до 12,5 мкл. Затем реакционную смесь прогревали при 70°C в течение 5 минут для разворачивания вторичной структуры и охлаждали на льду. Далее, к смеси добавляли (в указанной последовательности): 4 мкл 5X реакционного буфера (250 мМ Tris-HCl (pH 8.3) при 25°C, 250 мМ KCl, 20 мМ $MgCl_2$, 50 мМ DTT), 0,5 мкл (20 ед.) RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл 10 мМ смеси dNTP (конечная концентрация - 1 мМ), 1 мкл (200 ед.) RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. Конечный объем реакционной смеси составляла 20 мкл. Затем осторожно перемешивали и инкубировали смесь в течение 5 мин при 37°C. Реакцию проводили в течение 1,5 часов при 42°C в водяной бане. Реакцию останавливали прогреванием в течении 10 мин при 70°C. Полученный продукт хранили при -20°C [200, С. 43].

2.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для проведения аналитических процедур использовали полимеразу *Taq* (Fermentas #EP0402), а для препаративных - *Pwo* (Roche Cat. No. 11644955001). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1 мкл продукта обратной

транскрипции, 2 мкл буфера для полимеразы, 4 мкл 25 мМ $MgCl_2$, 0,5 мкл dNTP (10 мМ), 0,5 мкл бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл), 0,3 мкл *Taq*- или *Pwo*-полимеразы, по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 пмол), 8,7 мкл dH_2O.

ПЦР-амплификацию проводили в следующих температурных режимах: денатурация при 94°С - 5 мин, 30 циклов амплификации при 94°С – 30 сек, 45-65°С (в зависимости от используемых праймеров) - 30 сек, 72°С – 30-150 сек (в зависимости от длины генов) и заключительная элонгация при 72°С - 5 мин, после была пауза при 4°С.

Для клонирования, определения наличия и эффективности интеграции генов методом ПЦР мы использовали специфические праймера (таблица 4).

Таблица 4 – Последовательности праймеров использованных в работе

Праймер	Последовательность 5'- 3’
Pr-1	5’- ATTTTAGCAGATGCGCGCACC -3’
Pr-2	5’- GTTTTTCTCAACATTCAAGGAAAG -3’
Pr-3	5’- GGAGGCCCAGAATACCCTCCTTGA -3’
Pr-4	5’- ATGAAGTTTCAGAGCACTCT -3’
Pr-5	5’-TCAAAGATATGCCTCCAGGA -3’
Dir_*bgl1_Nde*I	5’- AAAAGCTTCATATGAAGGATGACTTGGCC-3’
Rev_*bgl1_BamH*I	5’- AAGGATCCACTAGTCCGTAAGGGGGAAGCGG-3’
Dir_*cdt1_BamH*I	5’- GGATCCAAAAAAATGTCGTCTCACGGC-3’
Rev_*cdt1_Hind*III	5’- AAGCTTAGCAACGATAGCTTCGGAC-3’
PrE1 (*bgl1*)	5’- CTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAATGAGATTTCCT TCAATTTTTACTGC -3’
PrE2 (*bgl1*)	5’- GCCTTGGCAACGTGTTCAACCAAGTCGATCAGATCTTATCG TCGTCATCC -3’
Pr1	5’- GTTTTTCTCAACATTCAAGGAAAG -3’
Pr2	5’- ATTTTAGCAGATGCGCGCACC -3’
Pr3	5’- ACCACTAGTGGGTAAGGGGGAAGCGGTG -3’
Pr4	5’- ACCGCGGCCGCAAAAATGAAGGATGACTTGGCC -3’
Pr5	5’- ACCAAGCTTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT -3’
Dir_*bgl1_Bgl*II	5’ - GGAGATCTTTATGAAGGATGACTTGGCCTACTCG -3’
Rev_*bgl1_Spe*I	5’- ACCACTAGTCAGTAAGGGGGAAGCGGTG -3’
Dir_*eGFP_Hind*III	5’- ACCAAGCTTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3’
Rev_*eGFP_Nhe*I	5’- ACCGCTAGCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG -3’
Dir_ADH1t_*Pme*I	5’- AACGTTTAAACGAGCGACCTCATGCT -3’
Rev_CYCt_*Asc*I	5’- AACGGCGCGCCCTTCGAGCGTCCCAA -3’
TEF_prom_Dir_*Not*I	5’- AAAGCGGCCGCGACATGGAGGCCCAG -3’
TEF_term_Rev_*Not*I	5’- AAAGCGGCCGCCAGTATAGCGACCAGC -3’
Dir_*cel6B_Sal*I	5’- AACGTCGACATGCAGTCTCAGTTATATGGCC -3’
Rev_*cel6B_Spe*I	5’- ACCACTAGTCTATAGAGGAGGGTTGG -3’
Dir_*cel7A_Xba*I	5’- ACCTCTAGAATGCAGCAAGCCGGAACA -3’
Rev_*cel7A_Pst*I	5’- AACCTGCAGCTACAAACATTGACTGTAGTA-3’

Праймеры, приведенные в таблице 4, были разработаны с использованием бесплатного программного обеспечения Primer 3 0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/

primer3/). Образование вторичных структур и димеров изучали в программном обеспечении Oligo Analyzer 1.0.3.0.

2.6 Рестрикция ДНК и ее элюирование

Рестрикцию амплифицированной ДНК и вектора для молекулярного клонирования мы проводили с использованием рестрикционных эндонкулеаз производства Thermo Scientific™ (США) и их соответствующих буферов. Соответствие эндонуклеаз и буферов друг к другу мы смотрели на сайте «DoubleDigest Calculator—Thermo Scientific».

Для рестрикции мы использовали реакционную смесь объемом 20 мкл, которая содержала: 2 мкл 10Х реакционного буфера, 0,5-2 мкг ДНК, 1-10 ед. каждой из рестриктаз и dH_2O до конечного объема 20 мкл. Рестрикцию проводили инкубированием реакционной смеси при 37°С в течении 20-60 минут. Продукты рестрикции анализировали в 1% агарозном геле методом электрофореза. После разделения нуклеиновых кислот в агарозном геле, необходимые фрагменты ДНК вырезали из агарозного геля и элюировали с помощью набора «GeneJET Gel Extraction Kit» (#K0692, Thermo Scientific™) согласно рекомендациям производителя.

2.7 Лигирование вставляемого фрагмента ДНК и вектора

Для лигирования продуктов рестрикции амплифицированной ДНК и векторов использовали ДНК-лигазу бактериофага Т4 производства фирмы Thermo Scientific™ (#EL0014). Лигирование вектора и вставки проводили в молярном соотношении 1:3. Для лигирования смешивали 2 мкл 10Х лигазного буфера, векторную ДНК, вставку и объем доводили до 20 мкл добавлением dH_2O. 0,2-1 мкл Т4-лигазы добавляли в последнюю очередь. Реакционную смесь осторожно смешивали пипетированием и инкубировали 60 минут при 16°С и далее при 4°С в течении ночи. По истечении срока инкубации лигазную смесь использовали для трансформирования компетентных бактериальных клеток.

Для вычисления количества вектора и вставки при выбранном молярном соотношении использовали онлайн калькулятор «Ligation calculator» по ссылке http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html.

2.8 Приготовление компетентных клеток *Escherichia coli*

Для получения компетентных клеток суспензию бактериальных клеток наносили на агаризованную LB среду методом штриха. Далее одиночную бактериальную колонию, выросшую в течении ночи, инокулировали с LB-агар чашки в 10 мл LB-среды (10 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl) и инкубировали при 37°С при сильной аэрации (200 об/мин на круговом шейкере) в течение ночи. Далее 1 мл ночной культуры ресуспензировали в 250 мл среды LB и выращивали при 37°С с сильной аэрацией в течение 2-4 ч до достижения плотности OD_{600} равной 0,3-0,4 (~10^8 клеток/мл). Культуру переливали в стерильные охлажденные центрифужные пробирки большой емкости и охлаждали на льду в течение 10 мин. Далее клетки собирали

центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин при 4°С.

Для приготовления хемокомпетентных клеток клеточный осадок ресуспендировали в 50-80 мл холодного буфера ТВ (10 мМ Pipes-NaOH (pH 6.7), 15 мМ $CaCl_2$, 0,25 мМ KCl, 55 мМ $MnCl_2$) и инкубировали 10 мин на льду. Суспензию клеток центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°С. Клеточный осадок ресуспензировали в 20 мл холодного ТВ буфера, добавляли 1,5 мл DMSO и инкубировали 10 мин на льду. Суспензию разливали на аликвоты и хранили при -80°С [200, С. 44].

Для получения электрокомпетентных клеток *Escherichia coli,* клетки собранные центрифугированием трижды отмывали в 200 мл автоклавированной и предварительно охлажденной dH_2O, а так же трижды охлажденным стерильным 10% раствором глицерина. Далее клетки собирали центрифугированием, надосадочную жидкость сливали. Осадок клеток ресуспензировали в 3 мл 10% раствора глицерина. Суспензию разливали по 200 мкл на аликвоты в охлажденные пробирки и замораживали в жидком азоте. Компетентные клетки хранили при -80°С [200, С. 45].

2.9 Трансформация клеток *Escherichia coli*

С помощью охлажденного стерильного наконечника 200 мкл суспензии компетентных клеток переносили в стерильную микропробирку. Сверху добавляли лигазную смесь ДНК (не более 50 нг или в объеме не более 10 мкл), осторожно перемешали и инкубировали на льду в течении 30 мин. По истечению времени инкубации клетки подвергали тепловому шоку на водяной бане в течении 90 сек при 42ºС и инкубировали 5 мин на льду. Сверху добавляли 800 мкл среды SOC (20 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 0,5 г NaCl, 20 мМ глюкозы) и инкубировали при умеренной аэрации (100 об/мин) в течение 45 мин при 37°С на качалке. Далее 200 мкл трансформированных компетентных клеток наносили на твердую агаризованную среду LB с соответствующими антибиотиками (100 мкг/мл ампициллин или 50 мкг/мл канамицин). Клетки равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды стерильным шпателем. Чашки инкубировали при 37°С в течении ночи.

Трансформацию электрокомпетентных клеток лигазной смесью проводили методом электропорации с использованием электропоратора «Bio-Rad GenePulse™». Для этого 50 мкл электрокомпетентных клеток переносили в заранее охлажденные специальные кюветы для электропорирования с зазором 1 мм. Далее в кювету с клетками наносили 1 мкл лигазной смеси и перемешивали пипетированием. Электропорирование проводили при силе тока - 2,5 kV, ёмкостном сопротивлении - 25μF, электрическом сопротивлении - 200Ом. После импульса к клеткам добавляли 1 мл питательный среды SOC и инкубировали при умеренной аэрации (100 об/мин) в течение 45 мин при 37°С на качалке. При заметном помутнении до 200 мкл трансформированных клеток равномерно распределяли на поверхности LB агара, содержащий соответствующий антибиотик (100 мкг/мл ампициллин или 50 мкг/мл канамицин). Чашки оставляли при комнатной температуре до подсыхания, после чего

переворачивали и инкубировали их при 37°С в течение ночи [200, С. 45].

2.10 Выделение плазмид методом щелочного гидролиза

Выросшие колонии после трансформации растили в 7 мл жидкой ЛБ среды с соответствующим антибиотиком в течении 12 ч при 37ºС. Ночные культуры центрифугировали в течении 2 мин при 13000 об/мин. Осадок в виде клеток ресуспензировали в 100 мкл раствора №1 (50 мМ глюкоза, 10 мМ EDTA, 25 мМ Tris-HCl (pH 8.0)) и инкубировали в течении 5 мин при комнатной температуре. Затем к смеси добавляли 200 мкл раствора №2 (0,2Н NaOH, 1% SDS), перемешивали содержимое несколько раз, переворачивая пробирку, и инкубировали в течении 10 мин на льду. После инкубации добавляли 150 мкл раствора №3 (на 100 мл: 60 мл 5 М ацетата калия, 11,5 мл ЛУК, 28,5 мл dH_2O) заранее охлажденного до -20ºС. Перемешивали и инкубировали в течении 10 мин на льду. Далее к смеси добавляли равный объем перегнанного хлороформа. После тщательного перемешивания полученную смесь инкубировали в течении 10 мин и центрифугировали в течении 5 мин при 4ºС со скоростью 13000 об/мин. Водную фазу переносили в новую микропробирку и проводили экстракцию с 6/10 объемом охлажденного (-20ºС) изопропанола, тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течении 15 мин. Далее смесь центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант сливали и осадок промывали 70% спиртом. Осадок содержащий плазмидную ДНК высушивали на воздухе и ресуспензировали в 50 мкл dH_2O [200, С. 47].

2.11 Приготовление компетентных дрожжевых клеток

Одиночную дрожжевую колонию с чашки YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% бакто-пептон, 2% глюкоза, 1,5% бакто-агар) инокулировали в 5 мл жидкой среды YPD и инкубировали при 30°С с сильной аэрацией (200 об/мин на круговом шейкере) в течение ночи. Ночную культуру ресуспендировали в 200 мл свежей среды YPD, налитой в колбу на 1 л, и инкубировали при 30°С с сильной аэрации в течение 4-6 ч до достижения плотности OD_{600} равной 1.0 ($2x10^7$ клетка/мл). По достижению оптимальной плотности, культуру клеток переносили в стерильные охлажденные центрифужные пробирки большой емкости и собирали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин при 4°С, надосадочную жидкость сливали. Осадок в виде клеток дважды отмывали в 10 мл заранее охлажденной автоклавированной dH_2O. Далее клетки собранные центрифугированием ресуспензировали в 1 мл стерильной TE/LiOAc (свежеприготовленной из 10XTE (0,1 М Tris-HCl, 0,01 М EDTA, pH 7.5) и 10XLiOAc (1 М LiOAc (pH 7.5)). Компетентные клетки хранили при 4°С в течении 3 дней [200, С. 47].

2.12 Трансформация дрожжевых клеток

С помощью охлажденного стерильного наконечника 50 мкл компетентных клеток дрожжей переносили в охлажденную микропробирку и смешивали с плазмидной ДНК, добавляли 100 мкг одноцепочечной ДНК бычьего тимуса (10

мг/мл ДНК бычьего тимуса кипятили 5 мин при 100°С и быстро охладили на льду в течении 5 мин). Добавляли 300 мкл свежеприготовленной стерильной трансформационной смеси (40% PEG 4000, 1XTE, 1XLiOAc) и тщательно перемешали встряхиванием на вортоксе. Смесь инкубировали при 30°С в течении 30 мин при перемешивании со скоростью 200 об/мин на круговом шейкере. По истечению времени инкубации добавляли 40 мкл DMSO и тщательно перемешали вортоксированием. Далее клетки подвергали тепловому шоку на водяной бане при 42ºС в течении 15 мин, после чего инкубировали 3 мин на льду. Трансформированные клетки равномерно распределяли на поверхности селективной агаризованной среды и инкубировали при 30ºС в течении 2-3 суток [200, С. 48].

2.13 Выделение геномной ДНК из дрожжей S*accharomyces cerevisiae*

После посева отдельных дрожжевых колоний с чашек на 5 мл богатой среды YPD с соответствующими антибиотиками, клетки инкубировали ночь при 30ºС на шейкере при 200 об/мин. На следующий день ночную культуру осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин при 4ºС и осадок клеток отмывали холодной автоклавированной dH_2O. После клетки ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (2% Triton-X100, 1% SDS, 100 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1 мМ EDTA), добавляли равный объем хлороформ-изоамилового спирта в соотношении 24:1 и 300 мг стеклянных бусинок, промытых в кислоте и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости в течение 3 мин. Далее к лизату добавляли 200 мкл 1XTE, перемешивали и центрифугировали со скоростью 12000 об/мин при 4ºС, 10 минут. Отбирая верхнюю фазу, проводили экстракцию НК с 2,5 объемом предварительно охлажденным изопропанолом (-20ºС). Затем плавно перемешивали и инкубировали в морозильной камере при -20ºС в течение получаса. После 30 мин 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 ºС. После завершения времени инкубации добавили 10 мкл 4 М ацетата аммония, 2,5 объема 96% этанола и помещали на 30 мин в морозильник на -20°С. Осадок собирали центифугированием, отмывали 70% этанолом, снова центрифугировали, осадок подсушивали и растворяли в 50 мкл dH_2O [201].

2.14 Оценка стрессоустойчивости промышленных штаммов дрожжей

Эффективность роста выбранных промышленных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* в стрессовых условиях, вызываемых фурфуролом, уксусной кислотой, этанола, гиперосмотическим стрессом, окислительным стрессом или высокой температурой анализировали по наличию роста разведеных культур на чашках. Для этого ночные культуры клеток откручивали из богатой жидкой среды YPD и дважды промывали осадок стерильной водой. Концентрацию ресуспендированных клеток выравнивали до OD_{600} (оптическая плотность при

600 нм) равной 1,0. Затем готовили 10-кратные серийные разведения суспензий клеток (10^0, 10^{-1}, 10^{-2} и 10^{-3}) и 50 мкл каждой разбавленной суспензии капали на соответствующие твердые YPD среды с фурфуролом, уксусной кислотой, этанола или KCl. Для определения влияния температуры чашки YPD с клетками икубировали в разных термостатах с 30, 35 и 42ºС.

Для определения устойчивости к окислительному стрессу каждый штамм клеток *S. cerevisiae* промывали в 100 мкл стерильной воды и ресуспендировали. Концентрацию клеток доводили до OD_{600} равной 2,0 и затем клетки смешивали с 20 мл YPD агара (охлажденного до приблизительно 50ºС) и сразу же заливали в чашки петри. Затем в центре каждой чашки клали стерильную фильтровальную бумагу (диаметр 20 мм) пропитанной с 20 мкл 30% H_2O_2. Сопротивление окислительному стрессу каждого штамма было продемонстрировано размерами диаметров зон ингибирования роста (мм) после культивирования в течение 2 дней при 30°С. Более меньшая по размерам зона ингибирования была интерпретирована как более высокая устойчивость к окислительному стрессу [202].

2.15 Определение скорости роста в аэробных условиях культивирования

Анализ роста дрожжевых клеток проводили путем инокуляции штаммов в трех повторностях. Ночные культуры предварительно культивировали аэробно в среде YPD при 30°С в течение 24 часов, затем клетки собирали центрифугированием при 1000 × g в течение 5 мин и дважды промывали дистиллированной водой. Осадок клеток ресуспендировали до начальной концентрации клеток OD_{600} равной 0,2 в 100 мл среды YP, содержащей 20 г/л глюкозы или целлобиозы в 250 мл колбах Эрленмейера (Erlenmeyer). Эти колбы инкубировали на шейкерах (250 об/мин) при 30°С в течение всего времени анализа. Через равные промежутки времени образцы были отобраны и разбавлены (1:10) в 2 мл воды, после чего на спектрофотометре были взяты показания оптической плотности (A600). Полученные данные умножали на фактор разведения. Для определения специфической скорости роста μ ($ч^{-1}$) в фазе экспоненциального роста было использовано по меньшей мере шесть последовательных точек данных. Специфическая скорость роста μ ($ч^{-1}$) расчитывалась по следующей формуле (1) [203]:

$$\mu\,(ч^{-1}) = \frac{\ln(OD_2 - OD_1)}{t_2 - t_1} \qquad (1)$$

2.16 Ферментативное производство этанола из целлобиозы

Чтобы определить эффективность ферментации с использованием целлобиозы, дрожжевые клетки предварительно культивировали аэробно в среде YPD при 30°С в течение 24 часов. Полученную ночную культуру собирали центрифугированием при 1000 × g в течение 5 мин и дважды промывали дистиллированной водой. Затем клетки ресуспендировали до начальной концентрации клеток, соответствующей OD_{600} равой 0,2 в 20 мл среды YP,

содержащей 20 г/л целлобиозы. Этанол-продуцирующая ферментация продолжалась при 30°C в течение 72 часов при слабом перемешивании в закрытых бутылках по 100 мл, каждая из которых снабжалась силиконизированной трубкой и обратным клапаном (Sanplatec Corp., Осака, Япония) для выхода CO_2. Анализ ферментации проводили в трех повторностях. Концентрации целлобиозы определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Sykam, Германия) на колонке Bio-Rad Aminex HPX-87P (300 × 7,8 мм). Температуру колонки поддерживали на уровне 85°C с помощью термодатчика колонки S4011, Sykam. Культуральную среду центрифугировали при 14000 × g в течение 10 мин, и полученный супернатант пропускали через фильтр с порами 0,22 мкм шприцем перед разделением на колонке. Связанный материал элюировали водой в виде подвижной фазы со скоростью потока 0,6 мл/мин и контролировали элюат с использованием детектора показателя преломления (Sykam, S3580). Концентрацию этанола в супернатанте культуральной среды определяли с помощью набора этанола (#K-ETOH, Megazyme).

2.17 Осаждение белков из культуральной жидкости и вестерн-блоттинг

Образцы собирались в разные моменты времени каждые 12 ч после инокуляции. Супернатанты культуры получали центрифугированием при 3000 × g в течение 5 мин и пропускали через фильтр с порами 0,22 мкм шприцем. Белки из дрожжевой культуры осаждали 20% (масса/объем) трихлоруксусной кислотой (TCA, конечная концентрация) [204]. Один объем 100% TCA смешивали с четырьмя объемами образца культуральной жидкости и инвентировали несколько раз для перемешивания, затем полученую смесь держали на льду от 1 часа до ночи и центрифугировали при 21000 × g в течение 30 мин при 4°C; супернатант сливали. Затем добавляли 0,5 мл ледяного ацетона (-20°C) и смесь центрифугировали при 21000 × g в течение 15 мин при 4°C. Супернатант снова сливали и полученный осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре. Наконец, осадок ресуспендировали в буфере RIPA (1% Triton X-100, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA (pH 80), 0,2 мМ Na_3VO_4, 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 150 мМ NaCl и 1 таблетка коктейля ингибитора протеазы Roche). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [205], в качестве стандарта, для которого был сывороточный альбумин бычьей сыворотки.

Присутствие TaBGL1 в супернатантах культуры трансформантов было подтверждено методом вестерн-блот-анализа путем разделения белков по молекулярной массе в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях электрофореза (SDS-ПААГ). Вестерн-блот-анализ общего секретируемого за 72 ч белка проводили с использованием моноклональных антител против FLAG эпитопа (Thermo Fisher) в качестве первичного антитела для обнаружения TaBGL1 и конъюгированных с пероксидазой хрена козлинных антител против кроличьих IgG в качестве вторичного антитела.

Белковые образцы готовили кипячением в 1X буфере для образцов (2X:125 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 10% β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0.02% бромфенолового

синего, 20% глицерина) в течении 5 мин при 100°C. Далее 12 мкг образца тотального белка наносили на 6% концентрирующий гель и проводили концентрацию белков при 90V. Разделение белков осуществляли в 10% геле при 180V. В качестве электродного буфера использовали стандартный Трис-глицинновый буфер pH 8.3 (25 мМ Tris-pH (8.3), 192 мМ глицина, 0.1% SDS). После завершения электрофореза проводили перенос белков на мембрану из поливинилдифторида (Pierce) в «Bio-Rad Mini-Transblot Cell». После переноса мембрану с белками инкубировали в блокирующем растворе, состоящем из 5% молока и 0,1% Tween 20 в 1×TBS (трис-буферный солевой раствор: 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 20 мМ NaCl) в течение 1 ч при комнатная температура. После удаления блокирующего раствора мембрану инкубировали в 10 мл аффинно-очищенного антитела против FLAG (разведение 1:1000 в блокирующем растворе с 0,1% Tween 20) в течение ночи при 4°C. На следующий день мембрану промывали пять раз в 10 мл промывочного буфера (1×TBS с 0,1% Tween 20) каждые 5 мин. После промывания мембрану инкубировали в 10 мл вторичного антитела (разведение 1:5000 в блокирующем растворе с 0,1% Tween 20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану промывали пять раз в 10 мл промывочного буфера, по 5 минут каждый раз. Раствор рабочего субстрата готовили путем смешивания равного объема раствора пероксида и раствора люминола (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad), и наносили по 0,1 мл/см^2 на площадь мембраны. Мембрану инкубировали в рабочем растворе в течение 2 мин в темноте, и затем подвергали воздействию мембраны на пленку «Kodak X-Omat».

2.18 Дегликозилирование белков с Endo H

Ферменты ENG1 и TaBGL1 дегликозилировали с использованием эндогликозидазы H (Endo H; New England Biolabs) в денатурирующих условиях в соответствии с рекомендациями производителя. Endo H (500 ед.) использовали для обработки 20 мкл концентрированной культуральной среды, оценка которой составляла приблизительно 1 мг/мл белка. Реагенты инкубировали в течение ночи при 37°C и исследовали с помощью SDS-ПААГ и окрашивания активности фермента.

2.19 Методы определения активности фермента эндо-1,4-β-глюканазы

Трансформированные клетки культивировали в течение ночи в 20 мл среды YPD, содержащей G418. Затем ночную культуру инокулировали в 1000 мл свежей среды с генетицином (100 мкг/мл) и КМЦ в конечной концентрации 0,1%, и культивировали при 30ºC в течение 5 суток. Каждые 24 часа снимали по 200 мл культуры клеток и осаждали центрифугированием в течение 7 мин при 3000 x g при 20ºC. Супернатант, содержащий сектерируемые белки, центрифугировали повторно. Клетки ресуспендировали в 50 мМ натрий ацетатном буфере и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости с добавлением обработанных кислотой стекляных бусинок диаметром 0,45 мм. Клеточный лизат центифугировали при 14000 x g в течение 30 мин.

Супернатант и культуральную жидкость использовали в качестве источника эндоглюканаз. Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда [205, P. 249], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

2.19.1 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 [206] с некоторыми модификациями.

К 1 мл культуральной жидкости, предворительно подогретой до 60ºС в течение 5 мин добавляли 1 мл субстрата (2% КМЦ в 100 мМ натрий ацетатном буфере, pH 6.0) и инкубировали в течение 60 мин при 60ºС. Реакцию остановливали 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 разводили в воде (0,2 мл реакционной смеси + 2,5 мл dH_2O) и адсорбцию раствора измеряли при 540 нм на спектрофотометре «ApelPD303 UV». За единицу активности принимали количество фермента, приводящий к образованию 1 мкМ востанавливающихся сахаров за 1 мин (на1 мл тотального белка) при данных условиях реакции.

2.19.2 Определения эндоглюканазной активности методом SDS-ПААГ-зимограммы

Для определения целлюлазной активности SDS-ПААГ электрофорезом, белки были разделены в геле (10% акриламидом и 0.1% SDS) содержащей 0.2% КМЦ. После электрофореза гель отмывали в 25% изопропаноле с постоянным перемешиванием в течение 30 мин при комнатной температуре для удаления следов SDS и ренатурации белков. Далее гель отмывали буфером (50 мМ натрий ацтатный, pH 6.0) в течение 30 мин и инкубировали 2 ч в этом же растворе при оптимальной температуре (60ºС) для активности фермента. Далее гель окрашивали 0,5%-ным водным раствором Конго красного в течение ночи при 37ºС и отмывали раствором 1 М NaCl три раза по 5 мин при комнатной температуре. Активность рекомбинантных белков проявлялась в виде просветления вокруг белковых полос [196, P. 6447].

2.19.3 Чашечный метод определения эндоглюканазной активности

Анализируемые клоны *S. cerevisiae* высевались на чашки со стандартной средой YPD, содержащей генетицин (G418) в конечной концентрации 100 мкг/мл и КМЦ в конечной концентрации 0,5%, соответственно, и выращивались в течение 3 суток при 30ºС. После смывали колонии клеток, в чашки заливали по 10 мл 50 мМ натрий ацетатного буфера (pH 6.0) и инкубировали в течение 2 ч при 60ºС. Окраску агаризованной среды проводили 0,5%-ным водным раствором

Конго красного в течение 30 мин рекомбинантных белков при комнатной температуре и периодическом перемешивании. После окрашивания чашки отмывали 1 М раствором NaCl три раза по 5 мин при комнатной температуре. Визуализацию эндо-1,4-β-эндоглюканазной активности производили при дневном свете [196, P. 6447].

2.20 Количественная оценка активности β-глюкозидазы

Активность β-глюкозидазы измеряли путем инкубации супернатанта из культур YPD и YPC с 8 мМ п-нитрофенил-β-D-глюкопиранозидом (pNPG, Sigma-Aldrich) в 100 мМ буфере ацетата натрия (pH 5.0), в течение 20 мин при 70°C. П-нитрофенол, высвобождаемый из pNPG, был обнаружен при 400 нм после добавления 1 М Na_2CO_3 [207, 199, P. 6]. Количество высвобожденного п-нитрофенила рассчитывали по калибровочной кривой. Единицу активности определяли как количество фермента, которое высвобождает 1 мкмоль р-нитрофенола (pNP) в минуту в данных условиях реакции. Все ферментативные анализы выполняли в трех повторностях.

2.21 Количественная оценка активности целлобиогидролаз

Активность целлобиогидролаз измеряли путем инкубации супернатанта из культур YPD и YPC с 1 мг/мл п-нитрофенил-β-D-целлобиозидом (pNPC, Sigma-Aldrich) в 100 мМ буфере ацетата натрия (pH 5.0), в течение 60 мин при 60°C. П-нитрофенол, высвобождаемый из pNPC, был обнаружен при 400 нм после добавления 1М Na_2CO_3. Количество высвобожденного п-нитрофенила рассчитывали по калибровочной кривой. Единицу активности определяли, как количество фермента, которое высвобождает 1 мкмоль р-нитрофенола (pNP) в минуту в данных условиях реакции. Все ферментативные анализы выполняли в трех повторностях [200, С. 52].

2.22 Щелочная предобработка соломы

Для щелочной предобработки солому измельчили до мелких частиц размером в несколько мм. Затем измельченные образцы пшеничной соломы замачивали в 2,5% растворе NaOH при соотношении 1:10 (твердое вещество/жидкость) в течение 1 часа при комнатной температуре. Позже образцы автоклавировали при 121°C в течение 60 мин. Затем образцы фильтровали и твердые остатки промывали водой до нейтральности [208]. После высушенную предобработаную солому использовали для ферментации в этанол.

2.23 Ферментативное производство этанола из авицел и предобработанной соломы

Производство этанола путем ферментации целлюлозосодержащих субстратов проводили при анаэробных условиях. Для этого дрожжевые клетки предварительно культивировали аэробно в 100 мл среды YPD при 30°C в течение 72 часов на шейкери при 200 об/мин. Затем осадок клеток собирали

центрифугированием в течении 5 мин при 3000 x *g* при комнатной температуре. Осажденные клетки ресуспендировали до начальной концентрации клеток, соответствующей OD_{600} равной 20 в 20 мл среды YP, содержащей 5% авицел или 5% предобработанной пшеничной соломы, и культивировали в течение 3 дней при при 30°C на шейкери при 100 об/мин. Образование этанола смотрели через 72 часа ферментации. Пробы, содержащие бродильный бульон (1 мл), отбирали из культуры клеток и хранили в 1,5 мл пробирках Эппендорфа, где клетки и другие твердые остатки удаляли центрифугированием в течении 5 мин при 3000 x *g*. Полученные культуральные жидкости из каждых проб анализировали на содержание этанола при помощи «Ethanol Assay Kit» (#K-ETOH, Megazyme).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Сравнение экспрессии гена 1,4-β-эндоглюканазы гриба *Aspergillius niger* в разных экспрессионных векторных системах

На сегодняшний день для более экономически выгодного получения этанола из лигноцеллюлозы, необходим её эффективный гидролиз и ферментация, которая может происходить только с применением рекомбинантных микроорганизмов, стабильно экспрессирующих гены целлюлаз, таких как 1,4-β-глюкозидаза, экзо-1,4-β-глюканаза и эндо-1,4-β-глюканаза. Для гетерологичной экспрессии целлюлитических ферментов широко используются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Однако, эффективная экспрессия гетерелогичных генов зависит от правильного выбора оптимального вектора – переносчика генетической информации. Наиболее часто используемые дрожжевые вектора, это интегративные вектора типа YIp (Yeast Integrating plasmid) и эписомальные YEp (Yeast Episomal plasmid) [209].

В связи с этим, мы в первоначальных экспериментах решили экспрессировать эндо-1,4-β-глюканазу (ENG1) гриба *Aspergillus niger* с использованием YIp и Yep экспрессионных векторов в лабораторном штамме дрожжей FF18733. Затем провести сравнительный биохимический анализ ENG1 в полученных рекомбинантных штаммах дрожжей.

Эндо-1,4-β-глюканаза гриба *A. niger* является основным компонентом целлюлаз и играет критическую роль в действии мультиферментной системы. Этот фермент первым атакует целлюлозу, гидролизуя внутренние β-1,4-гликозидные связи, в местах, удаленных от концов полимерных цепей, с образованием целло-олигосахаридов, таких как моно-, ди- и три-сахариды [210].

Для создания дрожжевого экспрессионного интегрального вектора использовали плазмиду p*HO*-poly-KanMX4-*HO*, любезно предоставленную профессором David J. Stillman (университет Юты, США) [197, P. 2]. Данная плазмида содержит селективный маркерный ген KanMX4 (обеспечивает устойчивость к генетицину, G418) и два фрагмента *HO* гена для интеграции в *HO* локус генома дрожжевой клетки. В качестве YEp экспрессионого вектора и источника гена ENG1 использовали YEGAp/*eng1* вектор, содержащий последовательность, кодирующую ENG1 под контролем GAPDH промотора и терминатора, которая была любезно предоставлена доктором Hidehiko Kumagai (Киотский университет, Япония) [198, P. 438].

3.1.1 Создание рекомбинантного штамма *Saccharomyces cerevisiae* с помощью YEGAp/*eng1* и p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* экспрессионных векторов

Для конструирования вектора *pHO*-pGAPDH-*eng1*-KanMX4-tGAPDH-*HO,* экспрессирующего ENG1 с фланкированными гомологичными последовательностями к *HO* локусу эндонуклеазы, мы вырезали *Hind*III фрагмент плазмиды YEGAP/*eng1*, содержащий ген *eng1* гриба *A. niger* под контролем промотора и терминатора GAPDH. Фрагмент был заранее обработан

фрагметом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* для получения тупых концов. Далее его клонировали в порезанный по тупому и дефосфорилированному *Sma*I сайту плазмиды p*HO*-poly-KanMX4-*HO* (рисунок 15).

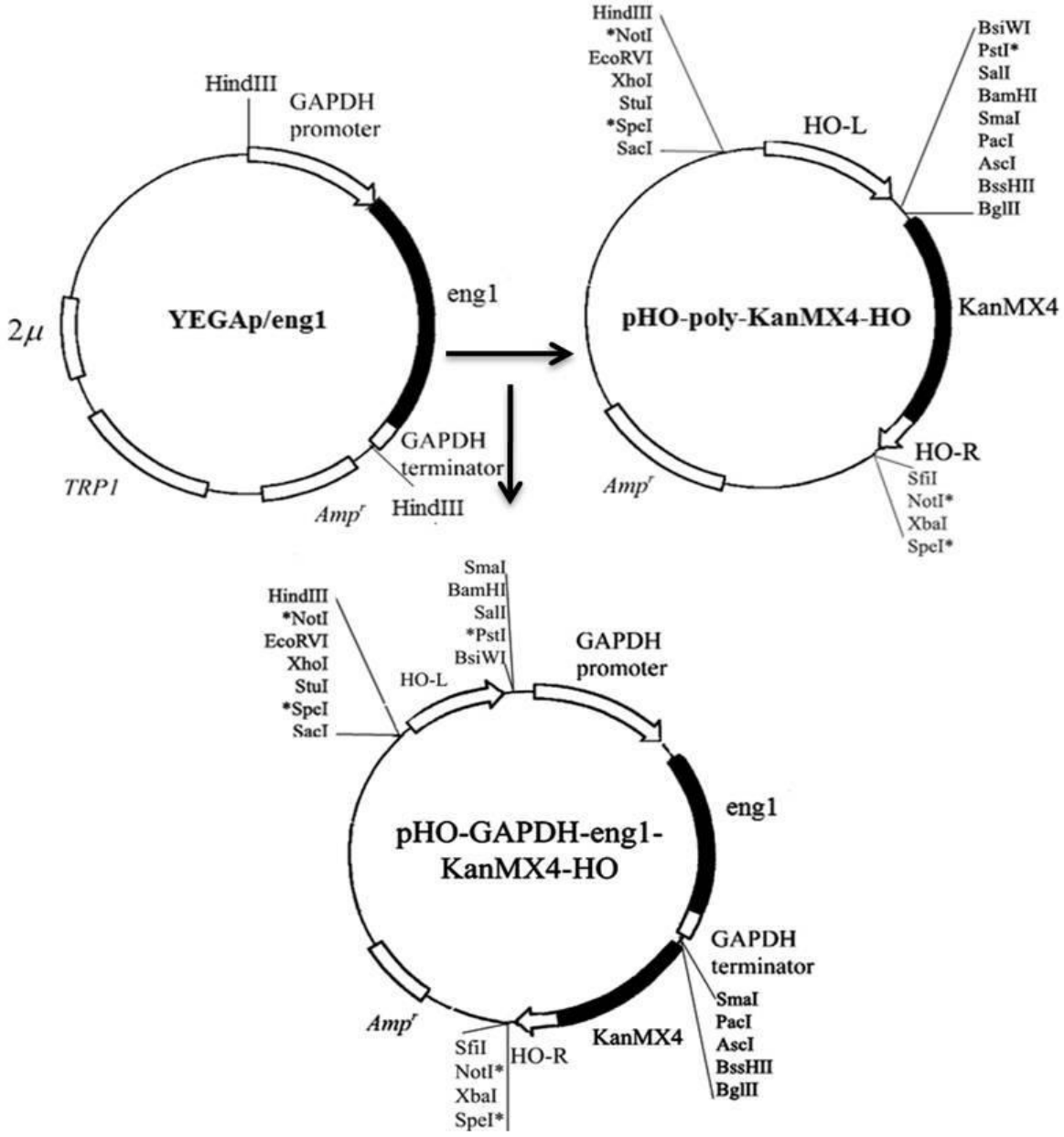
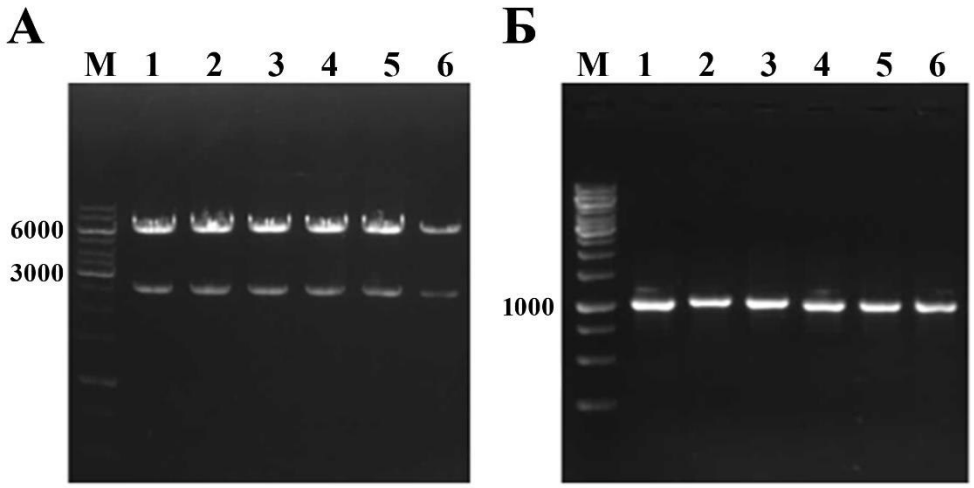


Рисунок 15 – Схема конструирования интегративного вектора для экспрессии эндо-1,4-β-глюканазы гриба *Aspergillus niger* в дрожжах

Продукт лигирования трансформировали в штамм *E. coli* JM109. Для идентификации рекомбинантного вектора проводили рестрикционный анализ по сайтам *BamH*I и *Bgl*II. В результате рестрикции на агарозном геле было выявлено два фрагмента ДНК с ожидаемыми размерами около 2,8 и 6 т.п.н. (рисунок 16А). Рекомбинантная плазмида также проверялась с помощью ПЦР со специфическими праймерами к *eng1*. В результате был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около 1000 п.н, что полностью соответствует размеру

гена *eng1* (рисунок 16Б).



А) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды; Б) ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды. М – маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-6 – клоны рекомбинантных плазмид.

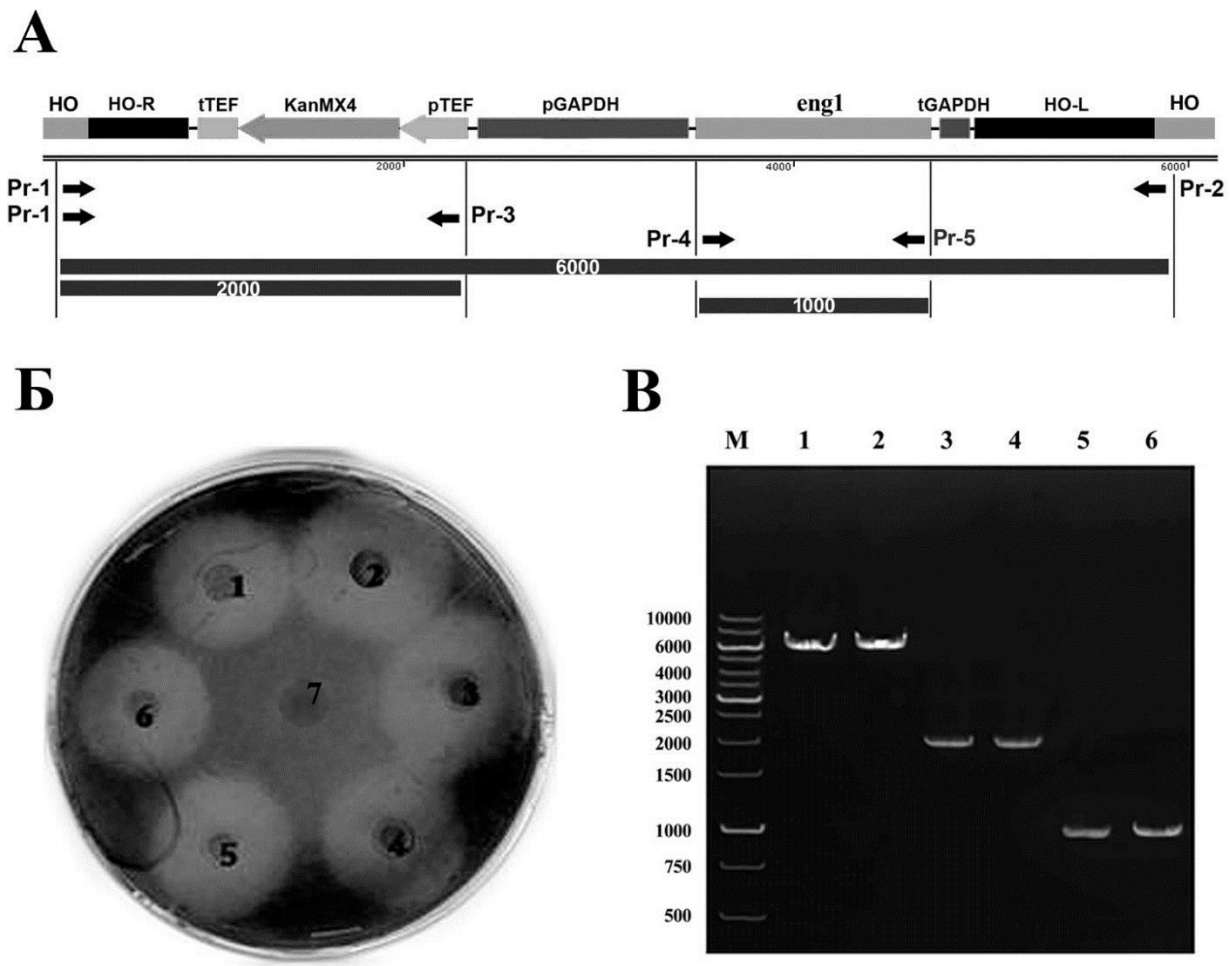
Рисунок 16 – Идентификации рекомбинантного вектора *pHO*-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-KanMX4-*HO*

В качестве экспериментального штамма для создания рекомбинантных дрожжевых клеток был выбран лабораторный экспрессионный штамм *S. cerevisiae* FF18733. Данный штамм не способен синтезировать 1,4-β-эндоглюканазу, что намного облегчает регистрацию рекомбинантного фермента в трансформированных клетках. К тому же он является ауксотрофным по гену TRP1 (ген участвующий в синтезе аминокислоты триптофана), что делает возможным селекцию трансформированных дрожжевых клеток в минимальной среде без триптофана. Трансформацию YEGAp/*eng1*, мультикопийной плазмидой, несущей ген TRP1 в качестве селективного маркера, в FF18733 штамм *S. cerevisiae* проводили методом с ипользованием лития ацетата (см. раздел «Материалы и методы исследования»). Колонии трансформантов, демонстрирующих фенотип прототрофа по триптофану, отбирали на SD агаризованных чашках, дополненных соответствующими аминокислотами. Рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae*, содержащие экспрессионную кассету YEGAp/*eng1*, были обозначены как FF18733/YEGAp-*eng1*.

Чтобы создать стабильно экспрессирующий ген *eng1* штамм дрожжей, сконструированный нами интегральный вектор p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*, несущий ген, кодирующий ENG1 с нативным сигнальным пептидом для секреции, был трансформирован в штамм *S. cerevisiae* FF18733. Для оптимизации интеграции в геном, конструкция *pHO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* была линеаризирована ферментами рестрикции *Xho*I и *Xba*I, и использована для трансформации клеток.

На рисунке 17А представлена схема участка интегрированной кассеты *pHO*-

KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* в *HO* локус, указаны специфические праймера, а также ожидаемые размеры амплифицируемых продуктов. Скрининг трансформантов проводили в агаризованной среде YPD, содержащей антибиотик G418. Кроме этого, рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae*, экспрессирующие ENG1, выявляли с помощью окрашивания 0,5% раствором «Конго красный» на агаризованной среде с КМЦ (рисунок 17Б).



А) Экспрессионная кассета в составе *HO* локуса хромосомы IV *S. cerevisiae* с указанными праймерами и ожидаемыми размерами амплифицируемых продуктов; Б) Анализ секреции 1,4-β-эндоглюканазы трансформированными клетками на чашках с КМЦ. 1-6 - рекомбинантные клетки *S.cerevisiae*, несущие p*HO*-pGAPDH-*eng1*-KanMX4-tGAPDH-*HO* кассету в *HO* локусе генома; 7 – трансформированная клетка *S.cerevisiae*, несущая p*HO*-poly-KanMX4-*HO*; В) Агарозный гель электрофорез продуктов ПЦР амплифицированных с Pr-1-Pr-5 праймерами. М - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-2 - ПЦР продукты полученные с праймерами Pr-1 и Pr-2; 3-4 - ПЦР продукты полученные с праймерами Pr-1 и Pr-3; 5-6 - ПЦР продукты полученные с праймерами Pr-4 и Pr-5.

Рисунок 17 – Анализ эффективности интеграции рекомбинантной конструкции и активности 1,4-β-эндоглюканазы на агаризованных чашках

Как показано на рисунке 17Б, вокруг колонии *S. cerevisiae,* трансформированных *pHO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* вектором, четко видны зоны просветления. Тогда как, вокруг трансформированных с *pHO*-poly-KanMX4-*HO* плазмидой у колоний зона просветления не обнаруживалась. Эти данные указывают на то, что ENG1 экспрессируется в активной форме и что нативный сигнальный пептид для секреции распознается секреторной системой *S. cerevisiae*.

Хромосомная интеграция вектора с геном *eng1* в *HO* локусе генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР с применением праймеров представленных в таблице 4 (см. раздел «Материалы и методы исследования») и с использованием геномной ДНК позитивных рекомбинантных штаммов в качестве матрицы (рисунок 17А и 17В). Создание праймеров для проверки интеграции сконструированной нами кассеты была основана на том, что один из ПЦР-праймеров комплементарен участку хромосомной ДНК, прилегающей к одному из гомологичных участков *HO* локуса (Например, Pr-1), другой праймер - участку нуклеотидной последовательности интегрированного вектора (Например, Pr-3). При встраивании интегративного вектора в случайный сайт, ожидаемый продукт амплификации (Pr-1-Pr-3) образовываться не должен, а при сайт-специфической интеграции, должен образовываться фрагмент ожидаемого размера.

Как показано на рисунке 17В (дорожки 1-2), амплификация части хромосомы, фланкирующей *HO* локус, с использованием Pr-1 и Pr-2 праймеров дала фрагмент ДНК ожидаемого размера (около 6000 п.н.), тогда как амплификация с праймерами Pr-1 (гомологичный части гена *HO*) и Pr-3 (гомологичный части гена KanMX4) дали ожидаемый фрагмент ДНК длинной 2000 п.н. (дорожки 3-4). Присутствие гена *eng1*, кодирующего ENG1, в дрожжевой хромосоме было подтверждено амплификацией дрожжевой ДНК с использованием ген-специфических праймеров Pr-4 и Pr-5 (дорожки 5-6). Результаты этих экспериментов подтверждают эффективную интеграцию кассеты *pHO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* в *HO* локус генома *S. cerevisiae*. Таким образом, нами был получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, содержащий в геномной хромосоме ген 1,4-β-эндоглюканазы гриба *A. niger*.

3.1.2 Анализ экспрессии рекомбинантной эндоглюканазы ENG1 в экспрессионном штамме *Saccharomyces cerevisiae*

Способность полученного штамма FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* секретировать рекомбинантный ENG1 определяли в культуральных жидкостях через 24-120 ч инкубации. Активность секретированной ENG1 быстро увеличивалась в течение 24 часов культивирования и через 48 часов достигла 840 единиц активности на мг белка. После 72 часов культивирования активность фермента поддерживалась на уровне 880±39 ед./мг. Культуральная среда контрольного родительского штамма *S. cerevisiae* FF18733 не проявляла эндо-1,4-β-глюканазную активность

(рисунок 18).

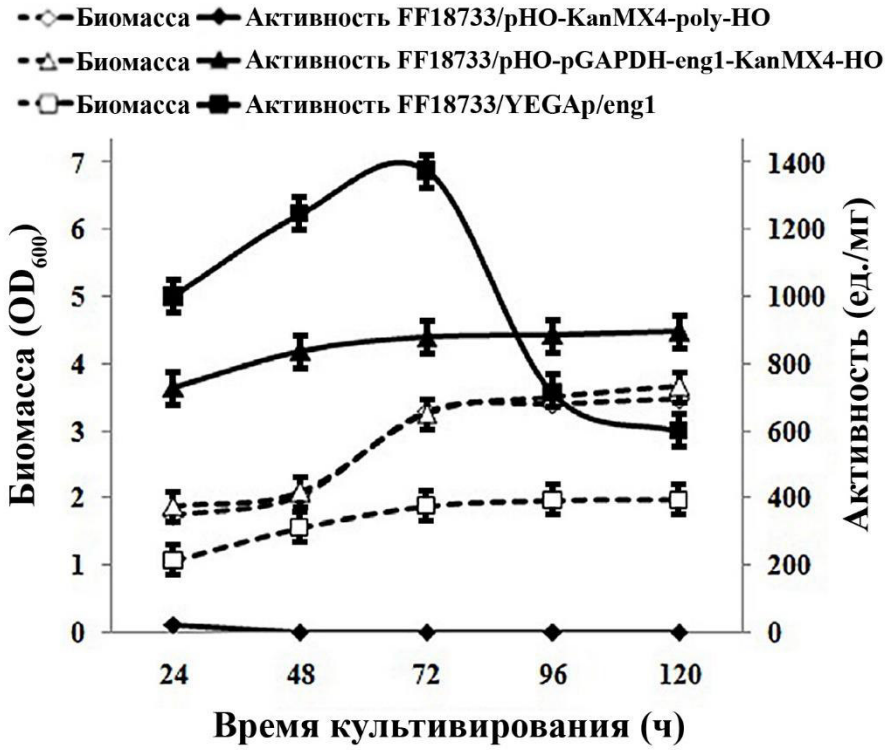


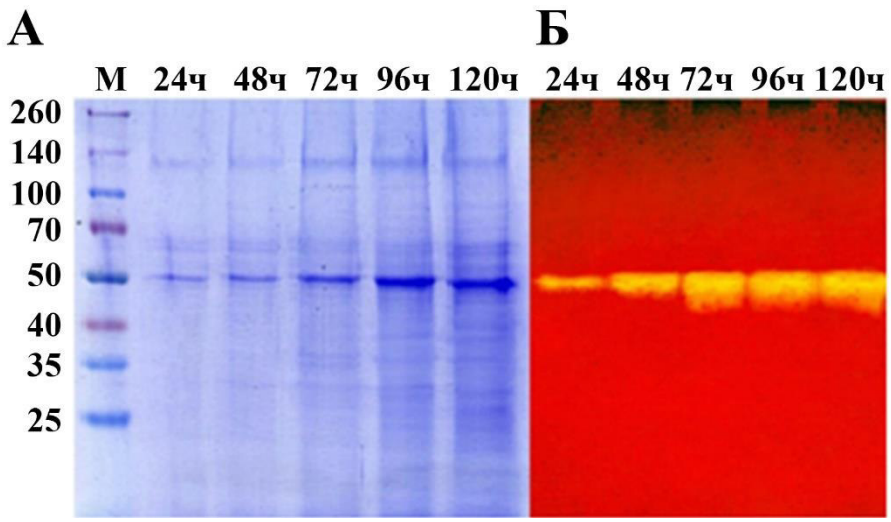
Рисунок 18 – Характеристики роста рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae* и ферментативная активность секретируемой ENG1

Важно отметить, что рекомбинантный штамм не проявил существенных различий в скорости роста и выходе биомассы по сравнению с контрольным родительским штаммом, что указывает на отсутствие какого-либо негативного влияния, продуцируемого гетерологичного белка в штамме дрожжей FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*. Мы также определили выход биомассы и активность секретируемого рекомбинантного фермента в штамме дрожжей FF18733, трансформированного многокопийным плазмидным вектором YEGAp/*eng1*. Данный вектор содержал сильный дрожжевой конститутивный промотор GAPDH, который обеспечивал высокий уровень синтеза соответствующей мРНК. В результате чего эффективно экспрессировался рекомбинантный белок ENG1.

Как показано на рисунке 18, активность фермента, секретируемого культивированным штаммом FF18733/YEGAp-*eng1*, значительно увеличилась в течение 72 часов после инкубации и была более чем в 1,5 раза выше, чем активность у FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* штамма. Дальнейшее увеличение времени инкубации культуры FF18733/YEGAp-*eng1* привело к значительному снижению активности фермента. Более того, штамм FF18733/YEGAp-*eng1* рос медленнее и давал более низкий выход биомассы по сравнению с дрожжами контрольного родительского и FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* штаммов.

В последующих экспериментах мы исследовали секрецию эндо-1,4-β-

глюканазы из трансформированных FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* клеткок *S. cerevisiae*. Для этого образцы для SDS-ПААГ электрофореза и определения активности готовили каждые 24 часа из культуральной жидкости. Анализ с помощью SDS-ПААГ выявил полосу белка с молекулярной массой приблизительно 50 кДа (рисунок 19А). При этом по мере увеличения времени инкубации увеличивалась интенсивность окрашивания этого белка.



А) SDS-ПААГ электрофорез, секретируемых белков *S. cerevisiae* Б) SDS-ПААГ зимограмма, секретируемых белков *S. cerevisiae*. М – маркеры молекулярной массы белков (кДА); 24-120ч - время культивирования в часах.

Рисунок 19 – SDS-ПААГ электрофорез и зимограмма белков из супернатанта культуры штамма FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*

Измерение активности ENG1 в геле SDS-ПААГ с использованием КМЦ в качестве субстрата, показало соответствие между активностью фермента и 50 кДа белком, что указывает на присутствие секретированного ENG1 в культуральной жидкости (рисунок 19Б). Следует отметить, что в клетках дрожжей контрольного родительского штамма полоса активного белка не была обнаружена (данные не показаны). Эти данные указывают на то, что основным секреторным белком в трансформированных клетках *S. cerevisiae* является ENG1 гриба *A. niger*. Кроме этого, при увеличении времени инкубации количество секретируемого 1,4-β-эндоглюканазы гриба *A. niger* увеличивалось, достигая максимума после 48 часов инкубации (рисунок 19Б).

В последующих экспериментах мы изучали секрецию рекомбинантного ENG1 в зависимости от времени культивирования штаммов дрожжей FF18733/YEGAp-*eng1*. Образцы для окрашивания SDS-ПААГ и для определения ферментативной активности получали каждые 24 часа из рекомбинантного штамма FF18733/YEGAp-*eng1*, выращенного в среде YPD. Интересно, что в

отличие от штаммов дрожжей FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*, штамм дрожжей с многокопийным плазмидным вектором YEGAp/*eng1* продуцировал белковую полосу при 44 кДа (рисунок 20А). Кроме того, изменение в молекулярной массе и гетерогенности белка ENG1 было замечено в эксперименте по определению активности окрашиванием (рисунок 20Б). ENG1 из культуры клеток FF18733/YEGAp-*eng1* в среде YPD постепенно смещался от более гомогенного белка в начале инкубации к гетерогенному белку с увеличением времени инкубации. Через 72 часа секретированный ENG1 состоял в основном из трех активных изоформ с молекулярными массами 37, 39 и 44 кДа. Белки с молекулярной массой 37 и 39 кДа не показывали четких полос в окрашенных кумасси гелях, что указывает на то, что эти белки присутствуют в низких концентрациях.

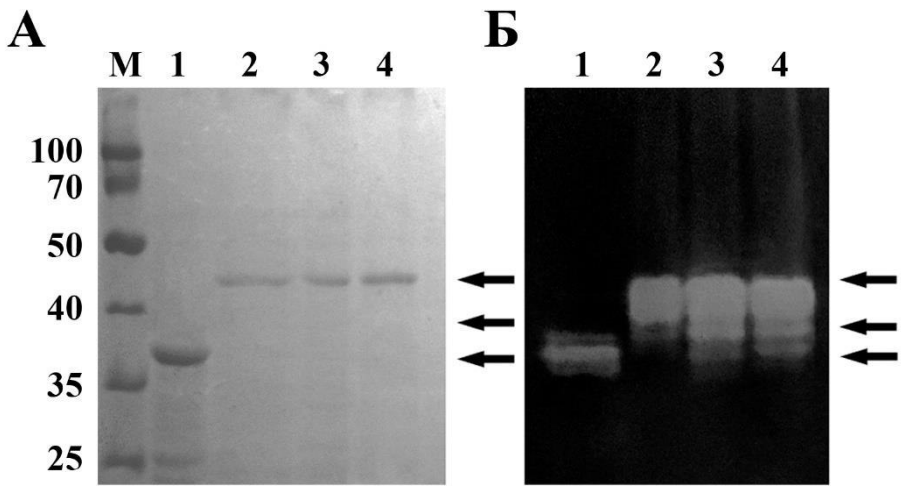
Сравнение эписомальной и интегративной систем экспрессии у *S. cerevisiae* показало, что активность ENG1 была выше в эписомальной, чем в интегративной конструкции в начале культивирования. Однако дальнейшее увеличение времени инкубации привело к значительному снижению активности фермента и более медленному росту культуры по сравнению с контрольным штаммом. Напротив, в случае с рекомбинантным штаммом FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*, мы не наблюдали подавления роста и активность ENG1 поддерживалась на протяжении всего времени инкубации.

Различия между двумя экспрессионными системами можно объяснить тем, что клетки дрожжей, трансформированных автономно реплицирующейся векторной ДНК, могут содержать до 40 копий плазмид на клетку [210, P. 9780; 211]. Следовательно, непрерывная экспрессия большого количества гетерологичного белка в штаммах FF18733/YEGAp-*eng1* могло привести к истощению энергетических ресурсов и нарушению клеточного метаболизма. Кроме того, эписомальную плазмиду, как правило, трудно поддерживать стабильно в клетках и относительно большое количество клеток теряет плазмиду, особенно в отсутствие селективного давления [19, P. 759].

3.1.3 Анализ N-гликозилирования секретируемого фермента

Как упоминалось выше, SDS-ПААГ анализ ENG1 из штамма FF18733/YEGAp-*eng1* выявил наличие трех ферментативно активных белковых полос с видимыми молекулярными массами 37, 39 и 44 кДа (рисунок 20А). Интересно, что молекулярная масса ENG1, секретируемого дрожжевым штаммом FF18733/pHO-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-HO, при анализе на SDS-ПААГ была намного выше (50 кДа), чем рассчитанная молекулярная масса фермента (37 кДа). Эти наблюдения показывают, что белок ENG1 при экспрессии в дрожжевых клетках имеет более высокую молекулярную массу, чем ожидалось. Такое увеличение молекулярной массы можно объяснить гликозилированием белка. Гликозилированные белки часто представлены в виде набора гликоформ различной молекулярной массы, различающихся по длине и составу олигосахаридных цепей, ковалентно связанных с белком [212]. Для проверки данного предположения аминокислотную последовательность 1,4-β-

эндоглюканазы анализировали на наличия сайтов N-связанного гликозилирования с помощью программы в базе данных NCBI. На оснований анализа первичной структуры 1,4-β-эндоглюканазы мы обнаружили четыре потенциальных сайта N-гликозилирования в позициях Asn-38, -100, -212 и -289, и три О-связанных сайта гликозилирования (рисунок 21А).

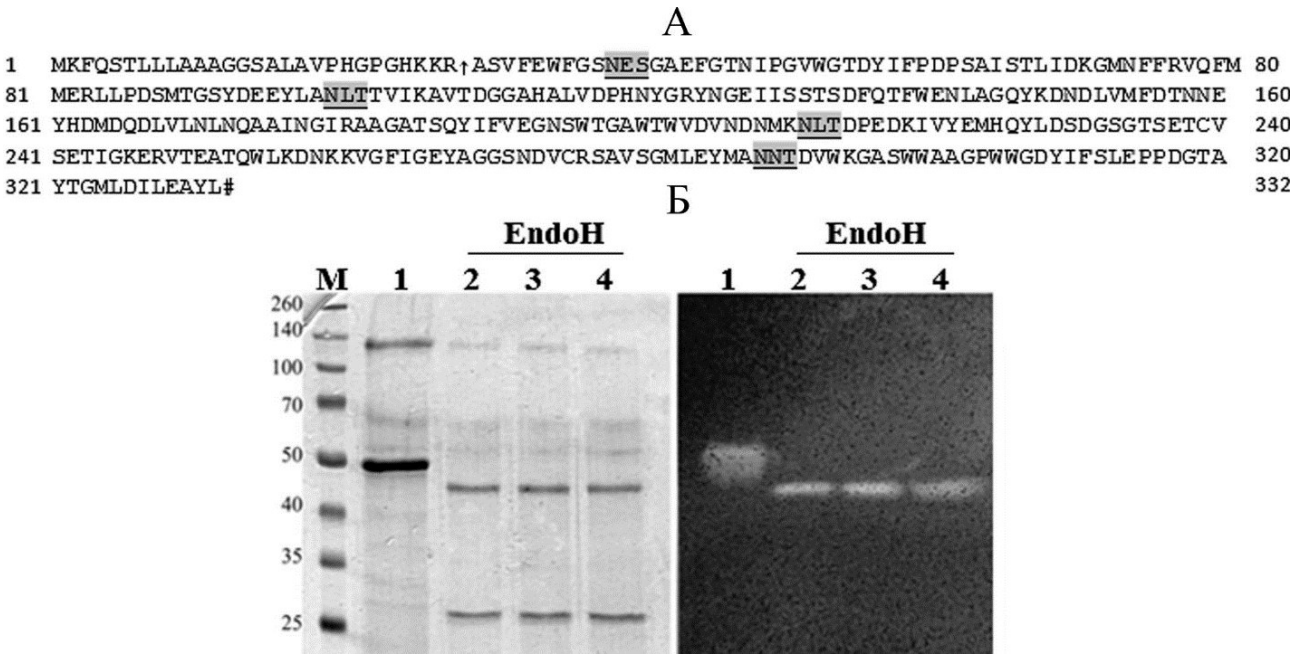


SDS-ПААГ электрофорез (А) и зимограмма (Б) концентрированного белка из культурального супернатанта FF18733/YEGAp-*eng1*. М – маркеры молекулярной массы белков (кДа); 1 - рекомбинантная эндо-1,4-β-глюканаза, расщепленная с Endo H; 2 – 24 ч инкубации; 3 - 48 ч инкубации; 4 - 72 ч инкубации.

Рисунок 20 – SDS-ПААГ электрофорез и зимограмма белков из супернатанта культуры штамма FF18733/YEGAp-*eng1*, обработанного с Endo H

Endo H (Эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза H, КФ 3.2.1.96) - высокоспецифическая эндоглюкозидаза, которая расщепляет связанные с аспарагином олигосахариды (N-гликозилирование), но не О-связанные олигосахариды [213]. Эффект Endo H является важным признаком, позволяющим говорить о типе гликозилирования белка. Поэтому в последующих экспериментах белки из культуральной жидкости полученных в результате культивирования FF18733/YEGAp-*eng1* штаммов *S. cerevisiae* инкубировали в присутствии 500 ед. Endo H в течение 24 часов. Затем Endo H обработанные белки анализировали с помощью SDS-ПААГ электрофореза. Как видно из рисунка 20А, дегликозилирование с помощью Endo H приводило к снижению молекулярной массы рекомбинантной эндо-1,4-β-глюканазы до расчетной молекулярной массы. Определение активности на SDS-ПААГ электрофореграмме также показали аналогичные результаты. Эти результаты показывают, что по-разному гликозилированные формы ENG1 присутствуют в FF18733/YEGAp-*eng1* штамме дрожжей. Далее, внеклеточные белки, секретируемые штаммом FF18733/pHO-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-HO, инкубировали с 500 ед. Endo H в течение 2, 6 и 12 ч, а затем продукты реакции

анализировали с помощью SDS-ПААГ. Как показано на рисунке 21, Эндо-Н-катализируемое дегликозилирование приводило к снижению молекулярной массы рекомбинантного ENG1 до примерно 45 кДа, что больше, чем рассчитанная молекулярная масса (37 кДа). Кроме того, зимограмма ферментативной активности с использованием SDS-ПААГ показали сходные результаты, что указывало на присутствие частично дегликозилированного ENG1.



А) – Аминокислотная последовательность с указанными сайтами N-гликозилирования; Б) SDS-ПААГ электрофорез и зимограмма концентрированного белка из культурального супернатанта FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*. М - маркеры молекулярной массы белков (кДа); 1 - секретируемый белок *S. cerevisiae*; 2-4 - обработанные с Endo H секретируемые белки *S. cerevisiae*.

Рисунок 21 – Аминокислотная последовательность, SDS-ПААГ электрофорез и зимограмма белков из супернатанта культуры штамма FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*

Кажется, что гетерологичный ENG1 фермент гипергликозилирован при использовании интегративной конструкции, чем в эписомальной конструкции. Мы можем предположить, что ENG1, экспрессированный в FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* штамме, сильнее гликозилирован в своих сайтах N-гликозилирования по сравнению с ферментом, экспрессированным в FF18733/YEGAp-*eng1* штамме дрожжей. Интересно, что длительная обработка гликозилированного ENG1 с помощью Endo H не приводила к образованию полностью дегликозилированного белка с молекулярной массой 37 кДа, но приводила только к относительно небольшому снижению молекулярной массы

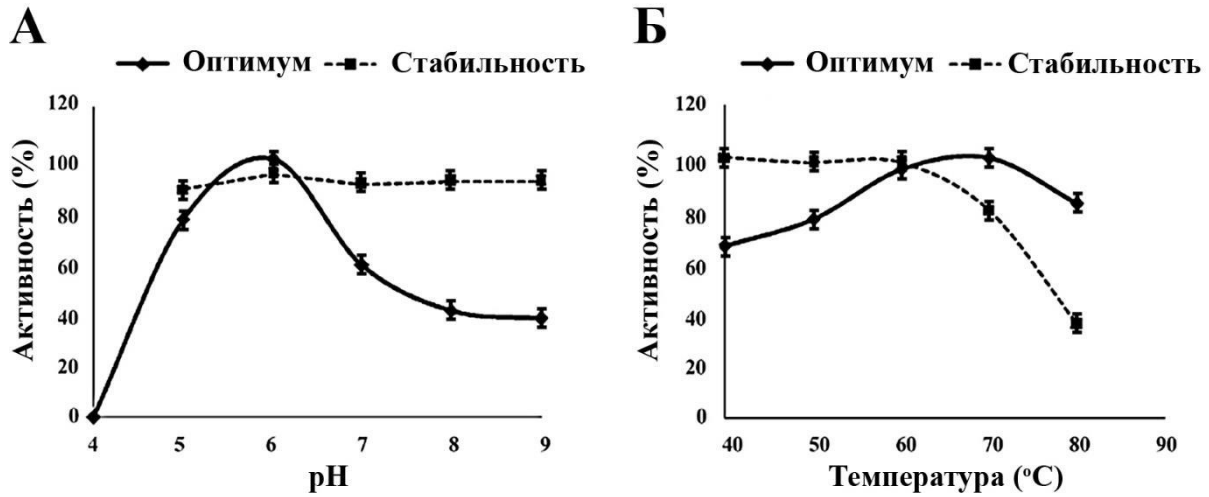
до 45 кДа. Эти результаты показывают, что увеличение молекулярной массы дегликозилированного рекомбинантного белка ENG1 может быть связано с дополнительным O-связанным гликозилированием фермента в рекомбинантных дрожжах FF18733/p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*.

Следовательно, мы предполагаем, что наблюдаемые различия в характере гликозилирования ENG1 обусловлены различием в посттрансляционных модификациях рекомбинантного белка, когда он экспрессируется с интегрированных генов, по сравнению с автономно реплицирующимися плазмидными векторами.

Гликозилирование является важной посттрансляционной модификацией белков, которая влияет на их стабильность, конформацию, секрецию и биологическую активность [214]. O-связанное гликозилирование важно для стабилизации фермента [215]. Вероятно, что O-гликозилированная форма ENG1 сохраняет более стабильную активность при непрерывном культивировании рекомбинантных дрожжей, чем только N-гликозилирована форма.

3.1.4 Характеристика ферментативной активности рекомбинантного ENG1

Определение биохимических характеристик рекомбинантного фермента проводили с использованием КМЦ в качестве субстрата. Чтобы определить влияние pH на стабильность фермента, препарат фермента инкубировали в буферных растворах при 60°C в течение 2 ч при различных значениях pH. Рекомбинантный фермент демонстрировал стабильность в широком диапазоне pH и более 90% от максимальной активности оставалось после инкубации в диапазоне pH 5,0-9,0 (рисунок 22А).



А) pH Оптимум и pH-стабильность; Б) Оптимальная температура и термостабильность.

Рисунок 22 – Активность рекомбинантной 1,4-β-эндоглюканазы гриба *Aspergillus niger* в зависимости от температуры и pH

Изучение влияния высокой температуры на активность рекомбинантного

ENG1 белка проводили при pH 6,0. Рекомбинантный фермент показал высокую термостабильность; 100% общей активности сохранялась после инкубации белкового препарата при 60°C в течение 2 ч, а 80% активности сохранялась после инкубации при 70°C в течение 2 ч (рисунок 22). В совокупности эти результаты показывают на термоустойчивость рекомбинантного фермента.

Эти данные согласуются с результатами, представленными Hong et al. (2001) [198, P. 439], что указывает на то, что стабильная экспрессия не изменяет свойства фермента.

Известно, что трансформированные клетки дрожжей содержат до 40 копий плазмид на клетку. В связи с этим при разработке генно-инженерной системы *S. cerevisiae* большое внимание уделялось созданию многокопийных векторных плазмид. Как отмечалось выше, данный тип плазмид обычно трудно стабильно поддерживать в клетках и, как правило, с относительно высокой частотой они утрачиваются клетками, особенно при отсутствии селективного давления по маркерам плазмид.

Ранее с использованием многокопийной эписомальной плазмиды были экспрессированы несколько различных форм эндо-1,4-β-глюканазы гриба *Aspergillus niger* в *S. cerevisiae* (таблица 5) [216, 217]. В нашей работе уровень экспрессии рекомбинантного фермента был намного выше, чем активность ферментов, выявленных в данных работах. Известно, что системы интеграции генов снижают количество гетерологично экспрессируемых белков, однако с практической точки зрения интегральные системы являются более подходящими для стабильности гена и предотвращения потери плазмид рекомбинантными дрожжами [218].

В ряде работ [219] созданы рекомбинантные штаммы дрожжей коэкспрессирующие целлюлазные гены с помощью дрожжевых векторов для интеграции в трех различных геномных локусах, а именно URA3, LEU2 и HIS3. Соответствующие мутанты широко используются в качестве ауксотрофных маркеров. Описанные подходы вынуждает 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 был 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* был помещен под контроль конститутивного GAPDH промотора и терминатора с целью конститутивной экспрессии в дрожжах.

Хотя в описанной работе был использован лабораторный штаммы *S. cerevisiae,* описанный подход может быть перспективным для конструирования промышленных штаммов дрожжей эффективно экспрессирующих гены целлюлаз.

Таблица 5 – Сравнение биохмической характеристики рекомбинантной *эндо*-1,4-β-глюканазы *A.niger* экспрессированных в различных системах

Эндо-1,4-β-глюканазы, Инвентарный номер в базе данных NCBI	Экспрессионный вектор	Экспрессионный штамм	Масса белка	Специфическая активность Ед/мг	°Т оптимум	pH оптимум	Субстрат	Источник
EglA A.niger ATCC 10574 AJ224451.1	pPICZαC	*Pichia pastoris*	30кДа	63.83	50	pH 4.0	КМЦ	Quay et al. 2011 [214, P. 200]
EglA A.niger CBS 120.49 AJ224451	pIM4490	*Kluyveromyces lactis*	30 кДа	59±5		-	КМЦ	Hasper et al. 2002 [215, P. 255]
EglB A.niger CBS 120.49 AJ224452	pIM4490	*Kluyveromyces lactis*	-	22±4	-	-	КМЦ	Hasper et al. 2002 [215, P. 256]
EglC A.niger CBS 120.49 AY040839.1	pIM4490	*Aspergillus niger*	-	19±1	55	pH 4.5	КМЦ	Hasper et al. 2002 [215, P. 257]
Eng1 A.niger IFO31125 AF331518.1	M4297	*Sacchoromyces cerevisiae*	43 кДа	714±18	60	pH 6.0	КМЦ	[196, P. 6449]

3.2 Создание промышленных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с геном *tabgl1* гриба *Thermoascus aurantiacus* и оценка их способности сбраживать целлобиозу в этанол

Как отмечалось выше, производство этанола из целлюлозосодержащих субстратов включает гидролиз целлюлозы в сбраживаемые сахара, процесс, который осуществляется с высокой эффективностью благодаря синергетическому взаимодействию трех ферментов, таких как эндо-1,4-β-глюканаз, экзо-1,4-β-глюканаз и 1,4-β-глюкозидаз. В результате ферментативной активности эндо-1,4-β-глюканаз и экзо-1,4-β-глюканаз целлюлоза превращается в целлобиозу. β-глюкозидазы не только обеспечивают гидролиз целлобиозы до глюкозы, но также повышают эффективность предыдущих стадий, поскольку целлобиоза является мощным ингибитором эндоглюканаз и целлобиогидролаз [193, С. 1088].

Хотя β-глюкозидазы также подвергаются ингибированию глюкозой, эта проблема может быть преодолена с помощью одновременного процесса осахаривания и ферментации (SSF-технология) рекомбинантными штаммами дрожжей экпрессирующими β-глюкозидазу. В этом случае глюкоза, являющаяся продуктом ферментативного гидролиза, преобразуется в этанол. Накопление этанола в среде позволяет избежать не только ингибирование активности β-глюкозидазы, но и контаминацию культуральной жидкости патогенной микрофлорой.

Однако, несмотря на большие усилия по созданию рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae*, способных утилизировать целлобиозу посредством экспрессии гетерологичных генов, кодирующих β-глюкозидазу, выход этанола и продуктивность полученных штаммов дрожжей все еще нуждаются в улучшении [220-223]. В этих работах в основном использовались лабораторные штаммы дрожжей, которые непригодны для использования в промышленных масштабах из-за их более слабой устойчивости к стрессовым факторам и низкой ферментирующей активности [224]. Кроме этого, показано, что эффективность синтеза гетерологичных белков [225], скорость роста [226] и выход этанола [227] варьируется в широких пределах в зависимости от генетического статуса и происхождения штаммов *S. cerevisiae*.

В связи с этим, для создания рекомбинантных штаммов дрожжей экспрессирующих ген *tabgl1*, мы использовали промышленные штаммы *S. cerevisiae* с разным генетическим фоном. Выбранные промышленные штаммы *S. cerevisiae* были выделены из процессов ликеро-водочного завода или же были рекомендованы для брожения лигноцеллюлозного сырья (таблица 2) [228].

Создание промышленных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* с геном *tabgl1* и оценка их способности сбраживать целлобиозу в этанол состояла из следующих этапов:

1) Конструирование интегративного экспрессионного вектора содержащий ген *tabgl1* для интеграции в *HO* локус генома дрожжей.

2) Создание промышленных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с геном *tabgl1* с сигнальным пептидом альфа-фактора дрожжей.

3) Сравнение темпов роста рекомбинантных промышленных штаммов дрожжей и ферментативной активности TaBGL1.

4) Анализ характера гликозилирования TaBGL1, синтезированного различными рекомбинантными штаммами *S. cerevisiae*.

5) Изучение особенностей роста рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae* и оценка выхода этанола в анаэробных условиях в присутствии целлобиозы в качестве единственного источника углеводородов.

6) Оценка устойчивости рекомбинантных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к индивидуальным стрессовым факторам.

3.2.1 Конструирование интегративного экспрессионного вектора, содержащей ген *tabgl1,* для интеграции в *HO* локус генома дрожжей

Для создания дрожжевого интегрального экспрессионного вектора с сигнальным петидом α-фактора дрожжей и кДНК геном *tabgl1* рекомбинантную плазмиду pBluescript IISK-*tabgl1*-flag расщепляли рестриктазами *Eco*RI и *Not*I. Продукт рестрикции *tabgl1*-flag лигировали в вектор pMETαB (см. раздел «Материалы и методы», таблица 3) по тем же сайтами рестрикции, для того чтобы слить ген *tabgl1*-flag с сигнальной последовательностью секреции α-спаривающего фактора. Затем для конструирования вектора *pHO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO,* экспрессирующего β-глюкозидазу с фланкированными гомологичными последовательностями к *HO* локусу эндонуклеазы, последовательность гена α-*tabgl1*-flag клонировали в вектор *pHO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* с помощью полимеразной цепной реакции с перекрывающимися цепями (overlap extension PCR) (рисунок 23) [229], используя прямой праймер PrE1 и обратный праймер PrE2 (см. раздел «Материалы и методы», таблица 4).

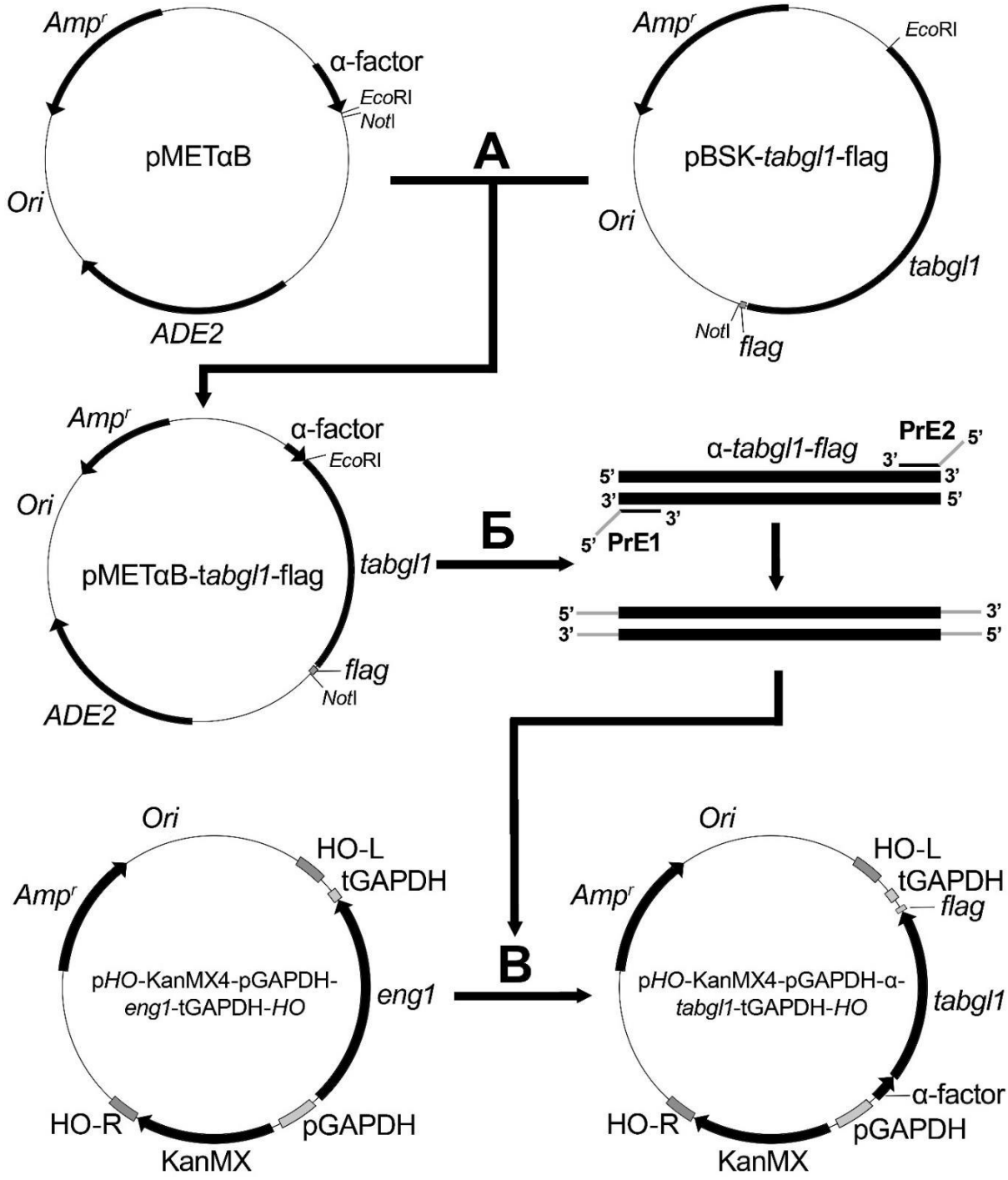
В результате чего был получен интегральный дрожжевой вектор содержащий селективный маркерный ген KanMX4, два фрагмента *HO* гена для интеграции конструкции в *HO* локус и ген α-*tabgl1* с сигнальной последовательностью секреции α-фактора дрожжей (см. раздел «Материалы и методы», таблица 3).

Правильная конструкция была подтверждена методами рестрикции с последующим секвенированием ДНК. Для идентификации рекомбинантного вектора проводили рестрикционный анализ по сайтам *BamH*I и *Bgl*II. В результате рестрикции на агарозном геле выявлено два фрагмента ДНК с ожидаемыми размерами около 6 и 3,9 тпн. (рисунок 24А). Рекомбинантная плазмида также проверялась с помощью ПЦР со специфическими праймерами к *tabgl1*. В результате был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около 2500 п.н, что полностью соответствует размеру гена *tabgl1* (рисунок 24Б).

3.2.2 Создание промышленных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae,* экспрессирующие *tabgl1* ген с сигнальным пептидом альфа-фактора дрожжей

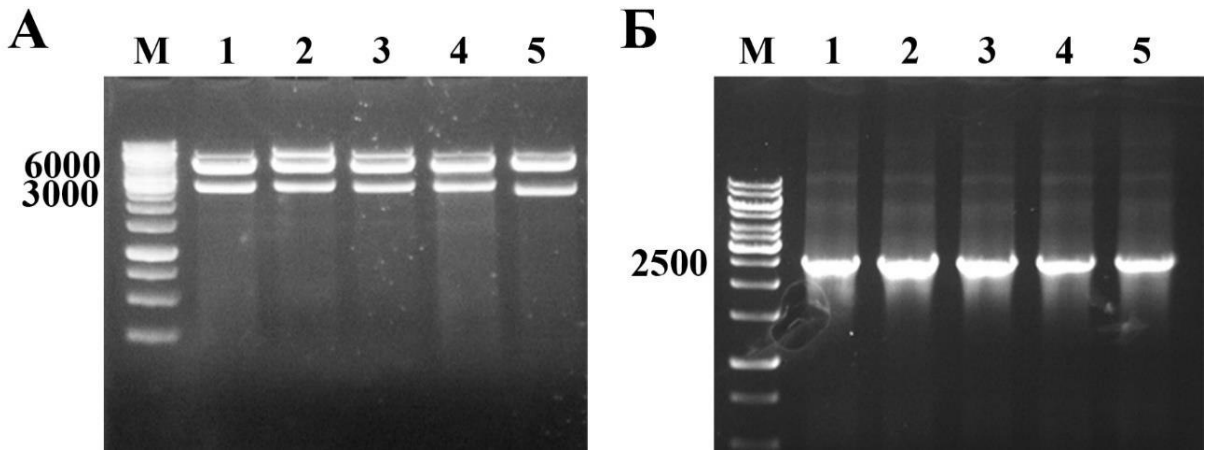
Для создания стабильно экспрессирующих промышленных штаммов дрожжей, *pHO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO* вектор был

линеаризирован ферментами рестрикции *NdeI* и *Xba*I и трансформирован в четыре генетически отдаленные промышленные штаммы *S. cerevisiae*.



А) Рестрикция pBluescript II SK-*tabgl1*-flag и pMETαB плазмидных векторов и лигирование вставки; Б) Амплификация последовательности гена α-*tabgl1*-flag; В) Клонирование последовательности гена α-*tabgl1*-1xflag, полученной на этапе Б, в вектор p*HO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO*.

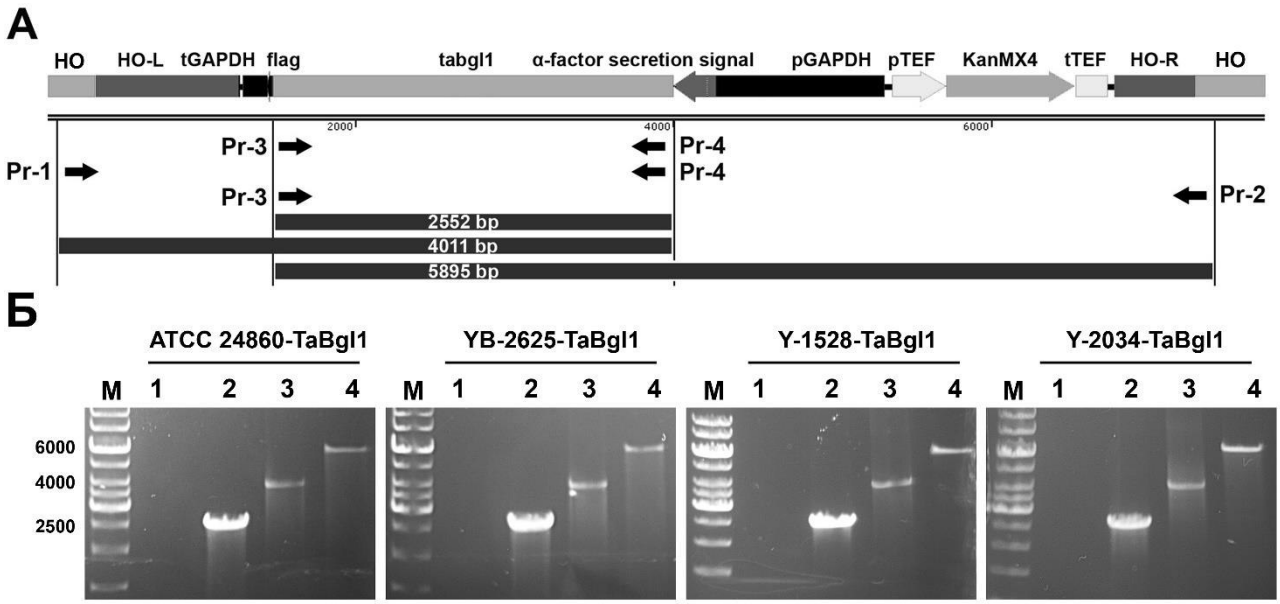
Рисунок 23 – Схема создания вектора *pHO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO*



А) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды; Б) ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды. М - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-5 - клоны рекомбинантных плазмид.

Рисунок 24 – Идентификации рекомбинантного вектора *pHO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO*

Нами сконструированный вектор предназначен для интеграции гена *tabgl1* в *HO* локус хромосомы дрожжей. Известно, что *HO* эндонуклеаза не экспрессируется в дрожжах с высокой плоидностью и активна только у гаплоидных организмов. Поэтому удаление гена *HO* не влияет на скорость роста и жизнеспособность дрожжей [197, P. 4]. Скрининг дрожжевых трансформантов проводили на агаризованой среде YPD, содержащей антибиотик G418. Далее, в G418 устойчивых колониях дрожжей проверяли интеграцию *pHO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO* кассеты в *HO* локус хромосомы с помощью ПЦР с праймерами Pr1 и Pr2 (гомологичные к последовательностям фланкирующим сайты интеграции) и Pr3 и Pr4 (ген-специфические праймера) (рисунок 25А; таблица 4). Примеры результатов ПЦР-анализа четырех промышленных штаммов дрожжей показаны на рисунке 25Б. Наличие гена *tabgl1* в хромосомах дрожжей была подтверждена амплификацией дрожжевой ДНК с генно-специфическими праймерами Pr3 и Pr4. Продукты ПЦР, полученные из различных дрожжевых штаммов с помощью праймеров Pr1 и Pr4, имели длину ~ 4000 п.н. Амплификация праймерами Pr2 и Pr3 приводило к образованию фрагмента ДНК длиной ~ 6000 п.н. во всех тестируемых штаммах дрожжей. Размеры продуктов амплификации полностью соответствовали ожидаемой длине фрагментов ДНК, предсказанных для правильной интеграции кассеты. В совокупности эти результаты подтверждают правильную интеграцию кассеты *pHO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO* в *HO* локус генома четырех промышленных штаммов *S. cerevisiae*. В качестве негативного контроля использовали штаммы дрожжей трансформированные с *pHO*-KanMX4-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-*HO* вектором без α-*tabgl1* гена. Как видно из рисунка 25 в негативном варианте не наблюдались продукты ПЦР со всеми вышеперечисленными праймерами.



А) Схема интегративной кассеты, содержащей ген *tabgl1* слитый с промотором GAPDH фланкированная гомологичными участками к локусу *HO* (HO-R и HO-L) IV хромосомы *S.cerevisiae;* Б) Электрофорез ПЦР продуктов в агарозном геле. М - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1 - отрицательный контроль; 2 - праймеры Pr3 и Pr4; 3 - праймеры Pr1 и Pr4; 4 - праймеры Pr2 и Pr3.

Рисунок 25 – Подтверждение правильной интеграции *pHO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO* кассеты в *HO* локус хромосомы дрожжей

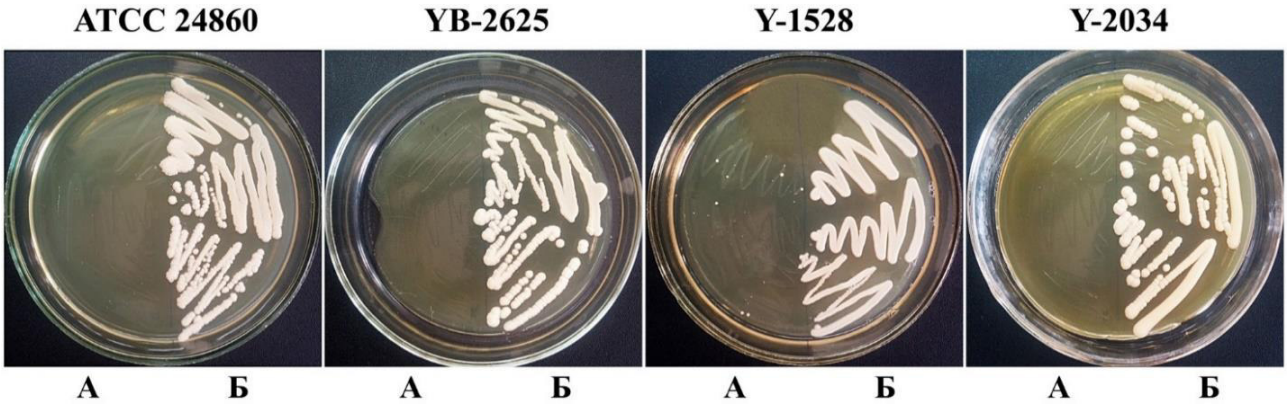
Как отмечалось выше, β-глюкозидазы играют важную роль в системе деградации целлюлозы, поскольку они обеспечивают превращение целлобиозы и целлодекстринов в глюкозу. Следовательно, рост рекомбинантных дрожжей на целлобиозе зависит от эффективности экспрессии гена β-глюкозидазы. Способны ли нами созданные рекомбинантные дрожжи использовать целлобиозу в качестве источника энергии? Для выяснения этого вопроса, мы рекомбинантные и родительские дрожжжевые клетки посеяли на агаризованую среду YP, содержащую 2% целлобиозу в качестве единственного источника углерода, и инкубировали при 30°С в течение 72 часов (рисунок 26).

Ни один из родительских штаммов не был способен расти на среде с целлобиозой. Тогда как, рост рекомбинантных штаммов *S.cerevisiae* был обильным в среде с целлобиозой (рисунок 26), что указывает на то, что TaBGL1 экспрессируется в достаточном количестве для того, чтобы обеспечивать рост дрожжей в среде с целлобиозой.

3.2.3 Сравнение темпов роста рекомбинантных промышленных штаммов дрожжей и ферментативной активности TaBGL1

Для проверки эффективности роста рекомбинантных штаммов, экспрессирующих ген *tabgl1*, мы культивировали дрожжи в течение 72 часов в YPD среде при аэробных условиях. При этом родительские штаммы с пустой

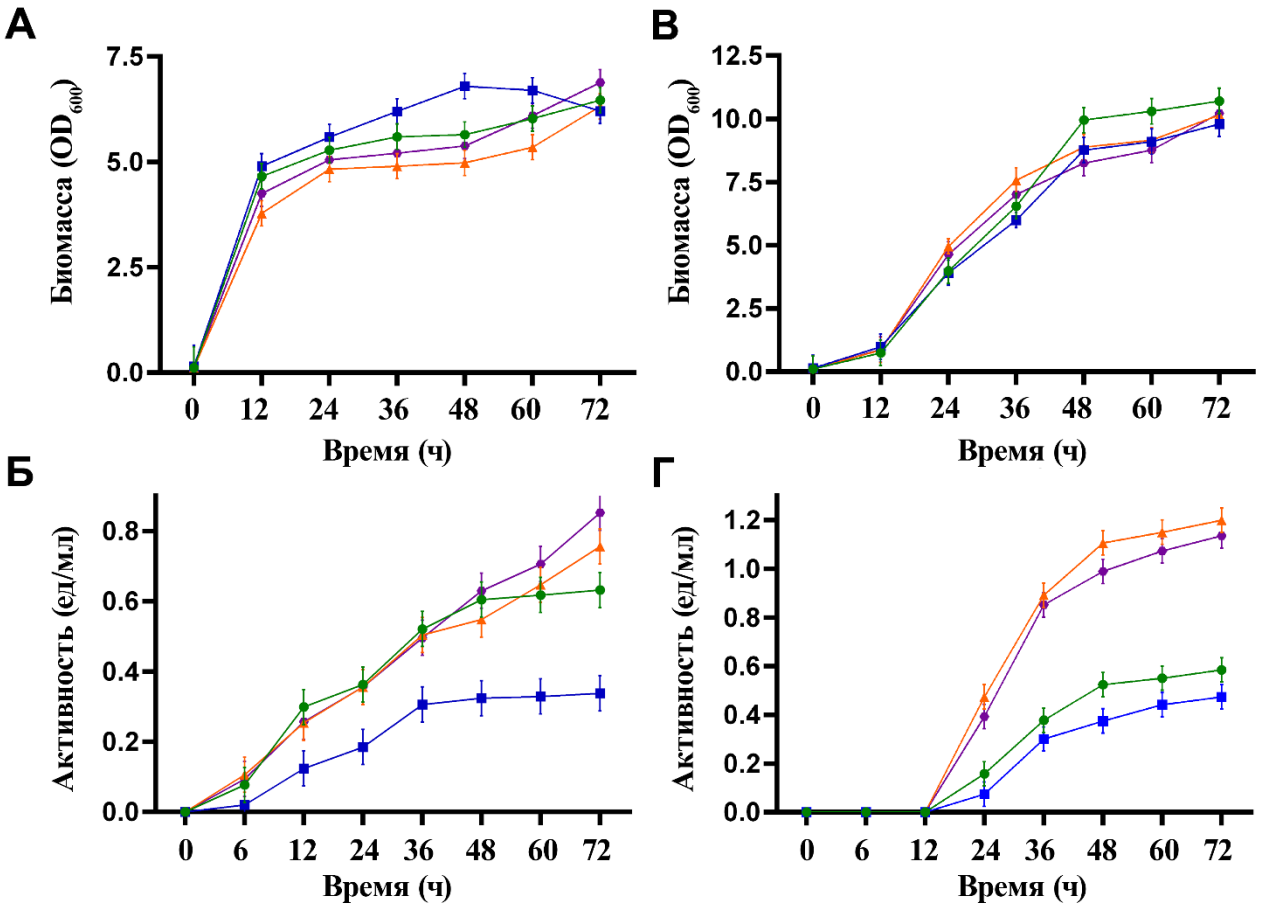
плазмидой служили в качестве контроля. Необходимо отметить, что рекомбинантные штаммы дрожжей росли в среде с 20 г/л глюкозы также эффективно, как и исходные родительские штаммы (данные не показаны), что указывает на то, что конститутивная экспрессия интегрированного гена *tabgl1* не оказывает вредного воздействия на способность роста дрожжевых клеток (рисунок 27А). Далее, мы рекомбинантные штаммы дрожжей и исходные родительские штаммы выращивали в YP среде с 20 г/л целлобиозой. В данном случае, как и в предыдущих условиях эксперимента, ни один из родительских штаммов не был способен расти на среде с целлобиозой. Тогда как, штаммы *S. cerevisiae*, трансформированные p*HO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO* вектором, хорошо росли на агаризованной среде YP, содержащей 2% целлобиозу.



А) Трансформированные родительские промышленные штаммы *S. cerevisiae* с пустой плазмидой; Б) *S. cerevisiae*, трансформированные с p*HO*-KanMX4-pGAPDH-α-*tabgl1*-flag-tGAPDH-*HO*.

Рисунок 26 – Анализ промышленных штаммов дрожжей на способность роста на агаризованой YP среде с целлобиозой

На рисунке 27А и 27В показаны кривые роста рекомбинантных штаммов дрожжей на среде с глюкозой и целлобиозой. Более высокие значения оптической плотности (OD_{600}: 9,80-10,71) наблюдались после 72 часов культивирования у рекомбинантных дрожжей в среде с 2% целлобиозой. Тогда как в среде с 2% глюкозой биомасса рекомбинантных дрожжей достигла значительно меньшего значения OD (OD_{600}: 6,21-6,89) по сравнению со средой с целлобиозой. При выращивании на среде с глюкозой (20 г/л) все рекомбинантные штаммы выходили в стационарную фазу через 12 ч, тогда как в среде с целлобиозой (20 г/л) они проявляли более медленный рост в течение первых 12 ч и достигали стационарной фазы роста к 46 часам. При этом следует отметить, что значение OD было примерно в 1,6 раза выше, чем OD в среде с глюкозой после 48 часов культивирования.



Динамика роста рекомбинантных дрожжевых штаммов на глюкозе (А) и целлобиозе (В); Внеклеточная активность β-глюкозидазы на глюкозе (Б) и целлобиозе (Г). Символы: (●) ATCC 24860-TaBgl1 (зеленый), (■) YB-2625-TaBgl1 (синий), (▲) Y-1528-TaBgl1 (оранжевый), (⬢) Y-2034-TaBgl1 (фиолетовый). Показаны среднии значения трех повторных экспериментов и их ошибки - стандартные отклонения от среднего.

Рисунок 27 – Динамика роста рекомбинантных дрожжевых штаммов, экспрессирующих ген *tabgl1,* и внеклеточная активность β-глюкозидазы

Можно предположить, что эти различия в росте дрожжевых клеток являются результатом эффективной секреции TaBGL1 в среду, содержащей целлобиозу. Чтобы проверить это предположение, мы проанализировали ферментативную активность TaBGL1 в культуральной среде в разные промежутки времени от 0 до 12, 24, 48 и 72 ч, используя 2% целлобиозу или 2% глюкозу в качестве единственного источника углерода (рисунок 27Б и 27Г). Несмотря на низкую активность TaBGL1 в течение первых 12 часов, дрожжевые штаммы Y-2034-TaBgl1 и Y-1528-TaBgl1 в последующие периоды культивирования проявляли значительно более высокую активность секретируемой β-глюкозидазы в среде, содержащей целлобиозу. Активность секретированной TaBGL1 в этих двух штаммах была примерно в 1,5 раза выше после 72 ч роста на целлобиозе по сравнению с клетками, культивированными в среде с глюкозой, за тот же период

времени культивирования. При этом, YB-2625-TaBgl1 рекомбинантный штамм показал сравнительно низкую активность секретированной β-глюкозидазы в среде как с глюкозой, так и с целлобиозой, тогда как штамм ATCC 24860-TaBgl1 проявлял высокую β-глюкозидазную активность только в среде с глюкозой. Следует отметить, что штаммы YB-2625-TaBgl1 и ATCC 24860-TaBgl1, несмотря на сравнительно низкий уровень активности секретируемого TaBGL1, достигали примерно того же значения OD, что и два других штамма с высокой секреторной активностью в YP среде с целлобиозой. β-глюкозидазная активность не была обнаружена в родительских дрожжевых штаммах, несущих пустой вектор без *α-tabgl1* гена.

Таким образом, несмотря на то, что все штаммы достигли почти одинаковых значений OD, внеклеточная активность TaBGL1 не коррелировала со значениями OD, хотя использовалась одна и та же регуляторная последовательность (GAPDH промотор и терминатор), и одна и та же векторная основа (*HO*). Можно предположить, что различия в активности секретированной TaBGL1 у разных штаммов дрожжей могут возникать из-за различия условий роста клеток (глюкоза или целлобиоза) или различием эндогенных клеточных факторов, участвующих в посттрансляционных событиях, включая гликозилирование белка. Правильный характер гликозилирования особенно важен в отношении гетерологически экспрессируемых белков [45, P. 301]. Изменение характера гликозилирования может влиять на стабильность белка и может изменять его активность или сродство к субстратам.

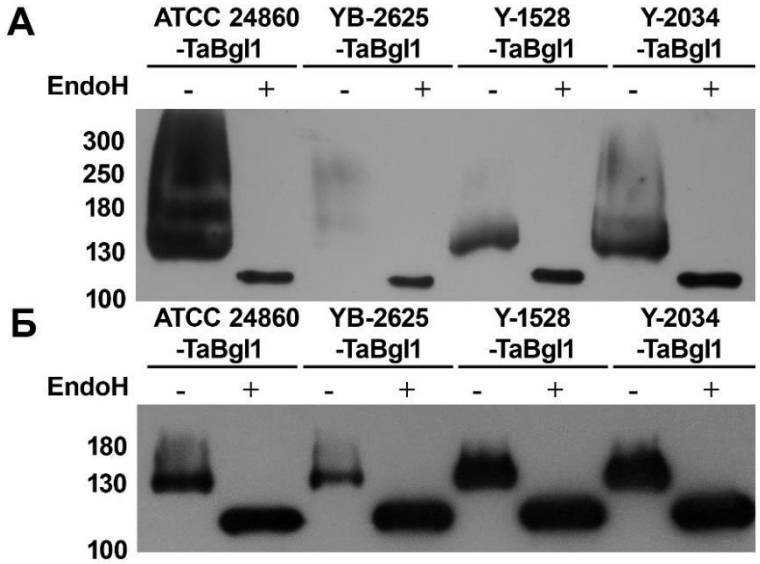
3.2.4 Анализ характера гликозилирования TaBGL1, синтезированного различными рекомбинантными штаммами *Saccharomyces cerevisiae*

Нами проведен анализ предполагаемых сайтов N-гликозилирования с помощью поиска последовательностей N-X-T/S (X – любая аминокислота, кроме пролина), соответствующих сайтам N-гликозилирования на сервере NetNGlyC 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). В результате выявлено присутствие восьми предполагаемых сайтов N-гликозилирования в TaBGL1(таблица 6).

Таблица 6 – Потенциальное N-гликозилирование TaBGL1

Позиция	Последовательность аминокислот	Потенциал	Результат N-Glyc
62	NLTT	0.6258	++
316	NLTI	0.6892	++
323	NGTV	0.6669	+
442	NGTL	0.8049	+++
524	NLTL	0.5509	+
543	NNTI	0.5474	+
565	NVTA	0.7494	++
714	NTTD	0.6542	+
Примечание - Сайт N-гликозилирования, предсказанный с помощью оценки «+», «++» или «+++», будет идентифицирован как потенциальный сайт с N-гликозилированным аспарагином.			

Чтобы исследовать посттрансляционные модификации TaBGL1, которые могли бы объяснить наблюдаемые различия в активности, мы выделили секретируемые белки (см. «Материал и методы исследования») из супернатантов культуры клеток, выращенных либо с глюкозой, либо с целлобиозой в течение 72 ч, а затем анализировали белок TaBGL1 методом SDS-ПААГ электрофореза. Во всех случаях белковые полосы мигрировали в виде плохо окрашенных, диспергированных полос, что характерно для гипергликозилированных белков. Вестерн-блот-анализ с анти-FLAG антителами подтвердил, что TaBGL1 присутствует в супернатанте культуры всех исследуемых штаммов дрожжей через 72 часа роста на целлобиозе. Тем не менее, молекулярная масса TaBGL1, секретируемого дрожжевыми штаммами, была намного выше (выше 130 кДа), чем расчетная молекулярная масса фермента (93,6 кДа). Обработка с Endo H, которая удаляет доступные N-связанные гликозильные остатки, давала отчетливую интенсивную полосу с более низкой молекулярной массой (~ 110 кДа во всех случаях), что весьма ближе к расчетной молекулярной массе белка TaBGL1 (93,6 кДа). Эти данные свидетельствуют о том, что TaBGL1, экспрессируемый в штаммах дрожжей, является гипер-N-гликозилированным (рисунок 28А).



Концентрированные образцы белков из культуральной среды дрожжевых трансформантов, выращенных на глюкозе (А) и целлобиозе (Б), инкубировали с (+) или без (-) фермента Endo H в течение 20 ч при 37°C.

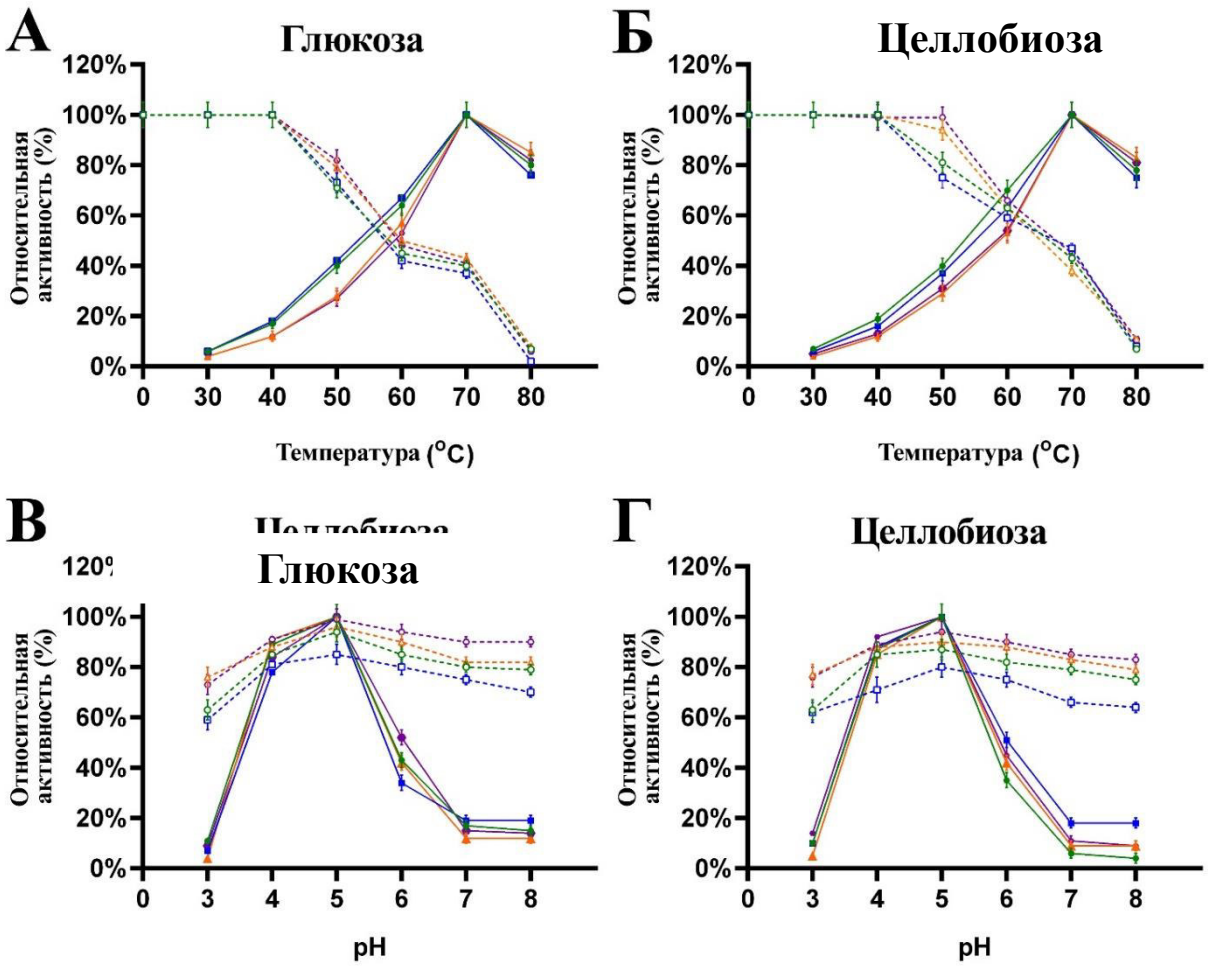
Рисунок 28 – Вестерн-блот анализ TaBGL1, секретируемый различными рекомбинантными штаммами *S. cerevisiae*

Однако, характер гликозилирования TaBGL1 значительно отличался среди рекомбинантных штаммов дрожжей, выращенных в среде с глюкозой. TaBGL1 ATCC 24860-TaBgl1 и YB-2625-TaBgl1 штаммов была представлена в виде диффузно-распределённых белковых полос с разной молекулярной массой,

тогда как в Y-1528-TaBgl1 и Y-2034-TaBgl1 штаммах TaBGL1 имела молекулярную массу сходную с TaBGL1 экспрессированной в среде, содержащей целлобиозу. При этом, Endo H обработанный TaBGL1 в обоих случаях (в среде с целобиозой или глюкозой) не показал различий в размере белка (рисунок 28А и 28Б), что указывает на то, что разница была вызвана количеством остатков маннозы. Эти результаты ясно показывают, что степень гликозилирования секретируемого TaBGL1 в значительной степени зависит не только от генетического фона штаммов дрожжей, но также от условий роста клеток.

Роль N-гликозилирования целлюлаз изучена в меньшей степени, предполагается, что N-связанные гликаны могут принимать участие в осуществлении правильного фолдинга ферментов, в процессах стабилизации белковой глобулы, в процессах связывания с субстратом [230, 231]. Показано, что сайты N-гликозилирования в структуре Cel7A *P.funiculosum* находятся рядом с активным центром и, вероятно, по-разному влияют на способность фермента связываться с субстратом и катализировать его гидролиз [232]. Следовательно, можно предположить, что наблюдаемые нами разные гликоформы TaBGL1 могут имеет разные ферментативные свойства. Для выяснения этого вопроса, мы сравнили биохимические свойства секретированной β-глюкозидазы дрожжевых клеток, выращенных в среде с глюкозой или целлобиозой. Были определены такие биохимические свойства, как pH- и температурные оптимумы активности по отношению к специфическому субстрату п-нитрофенил-β-D-глюкопиранозиду (pNPG). Определение pH-профиля активности фермента проводили путем измерения активности фермента по отношению к pNPG в диапазоне значений pH от 3,0 до 8,0. pH-профили относительной активности приведены на рисунке 29. Температурные профили активности ферментов проводили в pH-оптимуме их действия при различных температурах в диапазоне 30-80°C (рисунок 29). Поскольку ранее сообщалось, что N-гликозилирование повышает термостабильность белков [231, С. 1245; 233], мы также исследовали термостабильность этих ферментов. Как видно из рисунков 29А и 29Б, свойства рекомбинантной β-глюкозидазы из всех протестированных штаммов дрожжей были одинаковыми независимо от условий роста дрожжей (глюкоза или целлобиоза). Оптимальная температура для активности фермента была около 70°C, а оптимальный pH был около 5,0 (рисунок 29). Для тестирования термостабильности фермент инкубировали в течение 4 часов при различных температурах в диапазоне 30-80°C, а затем определяли остаточную активность. Результаты отображали в виде зависимости остаточной активности (в процентах от исходной) от значения температуры. Как видно из экспериментальных данных, рекомбинантные белки теряли свою активность после инкубации при температуре выше 40°C. Однако рекомбинантные ферменты из клеток, получавших целлобиозу, имели умеренно более высокую стабильность в температурном интервале от 40 до 60°C по сравнению с ферментами из клеток, выращенных в среде с глюкозой (рисунок 29Б). Независимо от условий роста дрожжей (глюкоза или целлобиоза) TaBgl1 был достаточно стабилен в широком

диапазоне pH (от 4,0 до 8,0). В этом случае фермент сохранил от 70 до 99% исходной активности, но при значении ниже pH 4,0 активность была относительно ниже. Среди всех протестированных штаммов дрожжей относительная активность TaBGL1 из штаммов дрожжей Y-2034-TaBgl1 и Y-1528-TaBgl1 сохраняла относительно более высокую активность как в кислых, так и в щелочных условиях pH по сравнению с другими штаммами.



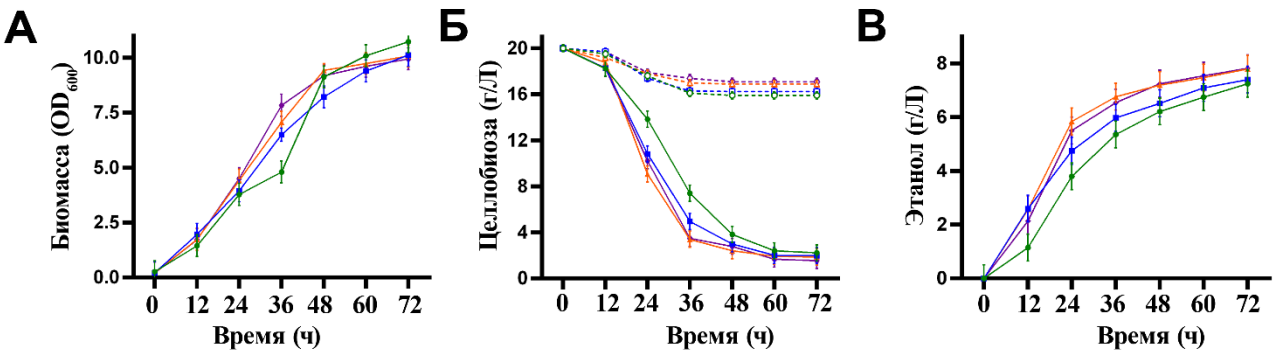
Влияние температуры в среде с глюкозой (А) и целлобиозой (Б); Влияние pH в среде с глюкозой (В) и целлобиозой (Г). Стабильность фермента обозначена пунктирной линией (○: ATCC 24860-TaBgl1 (зеленый), □: YB-2625-TaBgl1 (синий), Δ: Y-1528-TaBgl1 (оранжевый), ⬡: Y-2034-TaBgl1 (фиолетовый)) и оптимум фермента сплошной линией (●: ATCC 24860-TaBgl1 (зеленый), ■: YB-2625-TaBgl1 (синий), ▲: Y-1528-TaBgl1 (оранжевый), ⬢: Y-2034-TaBgl1 (фиолетовый)). Активность выражается в процентах от наибольшего значения. Анализы активности были выполнены в трех повторностях с указанием ошибок, представляющими стандартное отклонение.

Рисунок 29 – Влияние температуры и pH на активность рекомбинантного TaBGL1

Таким образом, экспериментальные данные ясно показывают, что степень гликозилирования секретируемого TaBGL1 зависит от генетического фона штаммов дрожжей и в значительной степени зависит от источников углерода присутствующих в среде культивирования (целлобиоза или глюкоза). Однако, различия в характере N-гликозилирования TaBGL1 не оказывало значительного влияния на биохимические свойства, как термостабильность, температурный и pH-оптимумы, однако приводило к изменению удельной активности ферментов.

3.2.5 Изучение особенностей роста рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae* и оценка выхода этанола в анаэробных условиях в присутствии целлобиозы в качестве единственного источника углеводородов

Характеристики штаммов, экспрессирующих TaBGL1, и родительских контрольных штаммов были исследованы в условиях анаэробного роста с целлобиозой в качестве единственного источника углерода. Подобно тому, что было обнаружено в экспериментах по аэробному росту, родительские контрольные штаммы не способны были расти на целлобиозе. Все четыре рекомбинантных штамма могли расти и продуцировать этанол из целлобиозы в качестве единственного источника углерода (рисунок 30В).



А) OD_{600} - оптическая плотность при 600 нм; Б) Потребление целлобиозы; В) Концентрация этанола в зависимости от времени. Дикие типы обозначены пунктирной линией (○: ATCC 24860-WT (зеленый), □: YB-2625-WT (синий), Δ: Y-1528-WT (оранжевый), ⬡: Y-2034-WT (фиолетовый)) и рекомбинантные штаммы сплошной линией (●: ATCC 24860-TaBgl1 (зеленый), ■: YB-2625-TaBgl1 (синий), ▲: Y-1528-TaBgl1 (оранжевый), ⬢: Y-2034-TaBgl1 (фиолетовый)). Показаны средние значения трех повторных экспериментов и их ошибки - стандартные отклонения от среднего.

Рисунок 30 – Изменение различных параметров рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae* при анаэробном росте в среде с 20 г/л целлобиозой в качестве единственного источника углерода и энергии

Дрожжевые штаммы YB-2625-TaBgl1, Y-1528-TaBgl1 и Y-2034-TaBgl1 показали более быстрый рост, о чем свидетельствуют максимальные

специфические скорости роста (таблица 7), и в конечном итоге достигли схожих OD в стационарной фазе (рисунок 30А). Эти три штамма употребили 90% всей целлобиозы в течение 48 часов. Напротив, при дальнейшей инкубации оставшаяся 0,2% целлобиоза (при концентрации 2 г/л) не потреблялась (рисунок 30Б). Несмотря на то, что штамм ATCC 24860-TaBgl1 рос очень медленно на целлобиозе (μmax 0,039 $ч^{-1}$), при этом показатели скорости потребления целлобиозы и OD были такими же, как у трех других рекомбинантных штаммов. Максимальное производство этанола для каждого из этих штаммов совпадало с уровнем потребления субстрата (рисунок 30Б и 30В). Выходы этанола приведены в таблице 7. Все штаммы, выращенные на целлобиозе, имели аналогичные выход этанола ~ 0,40 и 0,43 (г/г), что соответствует 75,6% и 79,9% от теоретического выхода этанола (0,538 [г этилового спирта]/[г потребленного сахара]).

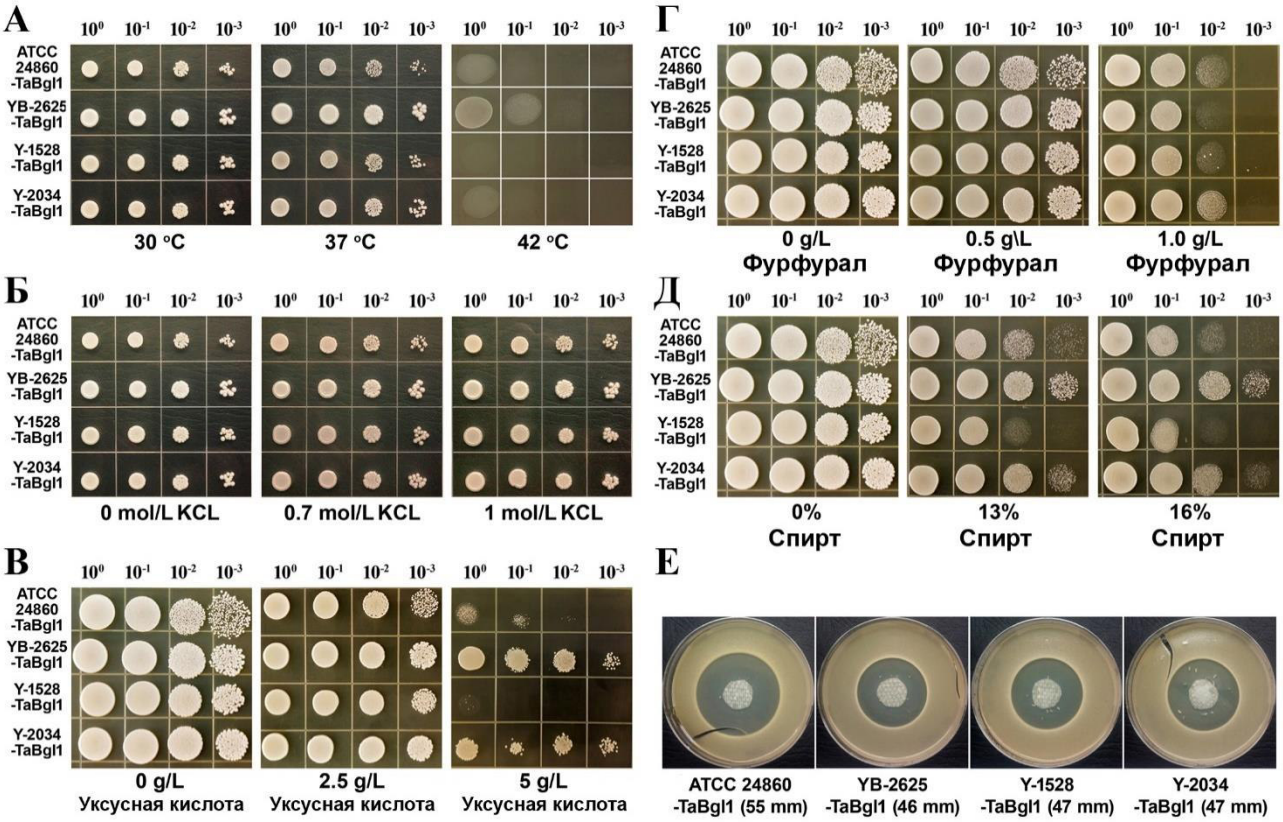
Следует отметить, что рост *S. cerevisiae* на субстрате, таком как целлобиоза, представляет собой сложное явление. Для того чтобы использовать целлобиозу в качестве источника энергии, во-первых необходима эффективная экспрессия гена β-глюкозидазы, затем фермент должен гидролизовать целлобиозу до глюкозы и потом использовать полученную глюкозу для производства биоэтанола. Следовательно, скорость роста на целлобиозе должна зависеть от уровня экспрессии гетерологичного фермента. В этом исследовании после сравнения рекомбинантных штаммов разного генетического фона мы не обнаружили корреляцию между уровнем экспрессии гена *tabgl1* и скоростью потребления целлобиозы и производства биоэтанола. В наших экспериментах в процессе ферментации все рекомбинантные штаммы дрожжей росли на целлобиозе и потребляли весь доступный сахар. Рекомбинантные штаммы Y-1528-TaBgl1 и Y-2034-TaBgl1, экспрессирующие TaBGL1, продуцировали этанол в среднем с выходом 77,6% от теоретического максимума (таблица 7). Напротив, штаммы ATCC 24860-TaBgl1 и YB-2625-TaBgl1 с гораздо меньшей активностью β-глюкозидазы показали относительно сходные показатели ферментации целлобиозы. Можно предположить, что ферментативной активности характерной для ATCC 24860-TaBgl1 и YB-2625-TaBgl1 достаточно для поддержки быстрого роста на целлобиозе. Это данные могут указывать на то, что как только синтез β-глюкозидазы превышает определенный порог, превращение целлобиозы в глюкозу уже не является ограничивающим скорость этапом в процессе ферментации.

Таблица 7 – Особенности роста и выход этанола на целлобиозе для рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae*, экспрессирующих TaBGL1

Штаммы	μmax ($ч^{-1}$)	Выход этанола ($г_{этанола}/г_{целлобиозы}$)	Выход этанола (%)	Выход этанола, г/л
ATCC 24860-TaBgl1	0.039 ± 0.01	0.407 ± 0,20	75.65	7.25 ± 0,36
YB-2625-TaBgl1	0.107 ± 0.05	0.410 ± 0,018	76.20	7.40 ± 0,33
Y-1528-TaBgl1	0.122 ± 0.03	0.430 ± 0,021	79.92	7.80 ± 0,37
Y-2034-TaBgl1	0.114 ± 0.06	0.424 ± 0,023	78.81	7.83 ± 0,39

3.2.6 Оценка устойчивости рекомбинантных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к индивидуальным стрессовым факторам

Успешная реализация производства лигноцеллюлозного биоэтанола зависит от выживания и работоспособности дрожжевых клеток в условиях общих стрессов, таких как токсичность этанола, осмотическое давление и высокая температура. Кроме этого, способность переносить действие разных ингибирующих рост соединений, образуемых в ходе гидролиза лигноцеллюлозы (фурфурол, уксусная кислота и фенолы), также является важным. В некоторых работах показано, что устойчивость к общим стрессовым факторам и ингибиторам зависит от генетического фона штаммов дрожжей [234, 235]. В связи с этим мы проверяли жизнеспособность рекомбинантных штаммов дрожжей в присутствии шести промышленно значимых стрессовых факторов, включая высокую температуру, высокую концентрацию этанола и различные концентрации KCl, уксусной кислоты, фурфурала и H_2O_2 (рисунок 31).



А) Температура; Б) Осмотический стресс с высокой концентрацией KCl; В) Уксусная кислота; Г) Фурфурал; Д) Этанол; Е) H_2O_2.

Рисунок 31 – Рост промышленных штаммов *S. cerevisiae* на чашках при различных стрессовых условиях

На рисунке 31А показано, что все штаммы хорошо растут при температурах 30 и 37°C и рост дрожжей останавливался при 42°C, хотя наблюдался слабый рост штамма YB-2625-TaBgl1. Устойчивость к гипертоническому стрессу для

всех штаммов была выше, потому что они росли на чашках с 1,0 моль/л KCl (рисунок 31Б). Штаммы YB-2625-TaBgl1 и Y-2034-TaBgl1 заметно росли лучше в присутствии 5 г/л уксусной кислоты (рисунок 31В). Устойчивость к фурфуролу была немного выше в штаммах ATCC 24860-TaBgl1 и Y-2034-TaBgl1, чем в других штаммах на чашках с фурфуролом в концентрации 1,0 г/л (рисунок 31Г). Штаммы YB-2625-TaBgl1 и Y-2034-TaBgl1 показали лучшую устойчивость к этанолу, так как хорошо росли при 16% этаноле (рисунок 31Д). Что касается устойчивости к H_2O_2, все штаммы показали хорошую устойчивость к этому окислителю, за исключением штамма ATCC 24860-TaBgl1. В отличие от других, этот штамм был менее стабильным, его диаметр ореола составлял 55 мм, в то время как для остальных трех штаммов диаметр ореола в среднем составлял 46,6 мм (рисунок 31Е).

На основании результатов, проиллюстрированных на рисунке 31 можно предположить, что штаммы YB-2625-TaBgl1 и Y-2034-TaBgl1 имеют лучший генетический фон из-за лучшего роста по сравнению с другими дрожжевыми клетками. Дрожжевые штаммы Y-2034-TaBgl1 и YB-2625-TaBgl1 показали превосходный уровень устойчивости к этанолу (до 16%) и уксусной кислоте (до 5 г/л) по сравнению с другими штаммами [236]. Однако генетическая основа ответа дрожжей у *S. cerevisiae* на стресс в присутствие уксусной кислоты остается неясной. Известно, что ответ дрожжей на стресс вызываемой уксусной кислотой включает транскрипционные изменения по всему геному. Например, положительная регуляция различных генов, участвующих в гликолизе, цикле Кребса и синтезе АТФ, была выявлена в дрожжевых клетках, культивируемых в присутствии уксусной кислоты, что указывает на существенные изменения углеводного и энергетического обмена в клетках, подвергнутых стрессу уксусной кислотой. Транскрипционный анализ в масштабе генома показал, что активаторы транскрипции *Haa1* и *Msn2* могут участвовать в регуляции адаптации дрожжей к уксусной кислоте [237]. Таким образом, можно предположить, что использованные нами промышленные штаммы обладают разными уровнями транскрипции соответствующих генов в ответ на стресс вызываемые слабыми кислотами. К тому же, было показано, что межклеточная гетерогенность также влияла на толерантность *S. cerevisiae* к уксусной кислоте, поскольку только фракция клеток с низкими начальными значениями pHi были способны восстанавливать pHi и возобновлять рост в присутствии кислоты [238]. Кроме того, не было обнаружено различий в чувствительности к стрессовым факторам окружающей среды между клетками дикого типа и рекомбинантными штаммами (данные не показаны), что указывает на то, что рекомбинантные штаммы, сконструированные в этом исследовании, могут быть промышленно привлекательными для производства лигноцеллюлозного этанола.

3.3 Создание промышленного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, коэкспрессирующий β-глюкозидазу гриба *Thermoascus aurantiacus* и мембранный переносчик целлодекстринов гриба *Neurospora crassa*

Как отмечалось в предыдущем разделе, одновременное осахаривание и

ферментация (SSF) обладает преимуществами, такими как снижение ингибирования конечного продукта при ферментативном гидролизе целлюлозной биомассы и минимизация потерь сахаров во время разделения и очистки [239, 240]. Однако, в ряде работ показано, что эффективного SSF целлюлозы добиться трудно без дополнительного добавления препарата β-глюкозидазы [241, 242]. Для улучшения эффективности SSF целлюлозы, сконструированы рекомбинантные дрожжи, экпрессирующие внеклеточную β-глюкозидазу (раздел 3.2). В этом случае глюкоза, являющаяся продуктом ферментативного гидролиза, напрямую преобразуется в этанол и позволяет избежать ингибирования активности β-глюкозидазы конечным продуктом.

Интересно отметить, что в модельном объекте целлюлолитических грибов *N. crassa*, при выращивании в среде с целлюлозой, значительно повышается транскрипция генов мембранных транспортеров целлодекстринов (CDT-1 и CDT-2), а также транскрипция гена кодирующего внутриклеточно синтезируемого BGLI [193, P. 1091]. Показано, что CDT-1 и CDT-2 обеспечивают транспорт целлобиозы, целлотриозы и целлотетрозы в цитоплазму [192, P. 85]. При этом внутриклеточно синтезируемый BGLI гидролизует целлобиозы до глюкозы в цитоплазме. Однако, эти целлюлолитические организмы не подходят для ферментации в промышленном масштабе, в связи с низкой скоростью роста, необходимостью, определенной культуральной среды для роста, а также необходимостью особого условия индукции экспрессии генов целлюлитических ферментов или невозможностью получения достаточного количества биотоплива [243].

В связи с этим, в качестве альтернативной стратегии, позволяющей обеспечить эффективный SSF целлюлозы, многие исследовательские группы предприняли попытку конструировать рекомбинантные *S. cerevisiae* путем интеграции внутриклеточных путей ферментации целлобиозы [193, P. 1090]. Предполагается, что конструированные, таким образом, рекомбинантные *S. cerevisiae* будут накапливать целлобиозу в цитоплазме, следовательно, конвертация целлобиозы в глюкозу будет происходить внутри клетки под действием внутриклеточной 1,4-β-гликозидазы. Данная стратегия с одной стороны будет предотвращать загрязнение дрожжевой культуры другими микроорганизмами, с другой стороны из-за накопления целлобиозы в цитоплазме ингибирование активности внеклеточных (секретируемых в культуральную жидкость) целлобиогидролаз и эндоглюканаз не будет возможным (ингибирование конечным продуктом по принципу отрицательной обратной связи). Этот подход значительно усилит эффективность прямой конвертации целлобиозы в биоэтанол.

В связи с этим, целью данного раздела является создание рекомбинантного штамма *S. cerevisiae* путем интеграции внутриклеточных путей ферментации целлобиозы. Для этой цели, нами выбран штамм Y-2034.

Создание промышленного штамма дрожжей *S. cerevisiae*, коэкспрессирующий ген *tabgl1* и мембранного переносчика целлодекстринов гриба *Neurospora crassa* состояла из следующих этапов:

1) Выделение кДНК гена мембранного переносчика целлодекстринов гриба *N.crassa* (CDT1).

2) Создание конструкции p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-eGFP-tCYC1-KanMX4-*HO*.

3) Создание промышленного штамма Y-2034 *S. cerevisiae* с генами *tabgl1* и *cdt1*.

4) Анализ трансформированного промышленного штамма дрожжей Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* на способность расти и производить этанол в жидкой среде с целлобиозой.

3.3.1 Выделение кДНК гена мембранного переносчика целлодекстринов гриба *Neurospora crassa* (CDT1)

3.3.1.1 Компьютерный анализ мРНК и аминокислотной последовательности мембранного транспортера целлодекстрина CDT1

Нами проведен компьютерный анализ нуклеотидной последовательности кДНК гена *cdt1* длиной 1740 пар нуклеотидов (номер XM_958708.2 в GenBank), кодирующего мембранный транспортер целлодекстринов (CDT1) мицелиального гриба отдела аскомицетов *Neurospora crassa.* Данный белок имеет длину 579 аминокислот с расчетной молекулярной массой 63,2 кДа и изоэлектрической точкой около 8,44 (рисунок 32). CDT1 имеет каталитический домен, включающий аминокислоты с 77 по 522, который позволяет классифицировать данный фермент как представителя главной и независимой группы вторичных мембранных транспортеров сахаров надсемейства MFS (Major Facilitator Superfamily). По данным компьютерного анализа этот фермент не должен секретироваться из клеток гриба, поскольку не имеет на N-конце сигнальный пептид.

На основании анализа первичной структуры CDT1 мы обнаружили 1 потенциальный сайт N-гликозилирования в позиции 232. В то же время было показано, что O-гликозилирование CDT1 потенциально может происходить по 6 сайтам (2, 117, 164, 382, 574 серин и 357 треонин).

3.3.1.2 Амплификация кДНК мембранного транспортера целлодекстрина гриба *Neurospora crassa* с помощью ОТ-ПЦР технологии

Для проведения синтеза кДНК гена *cdt1* гриба *Neurospora crassa* из мицелиев *N. crassa*, выращенных в лабораторных условиях, выделяли тотальный препарат нуклеиновых кислот. Часть препарата нуклеиновых кислот осаждали 3M LiCl, после чего препарат обогатился высокомолекулярными компонентами, поскольку низкомолекулярная тРНК осталась в надосадочной фракции.

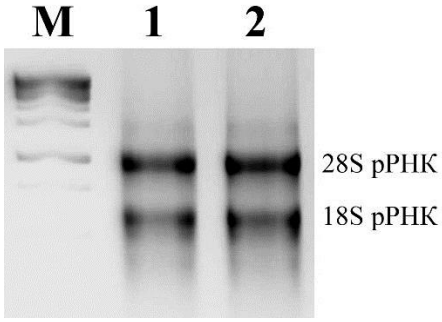
Электрофоретический анализ РНК на 0,8 % агарозном геле показал наличие 28S рРНК и 18S рРНК (рисунок 33). Измерение концентрации нуклеиновых кислот проводили на спектрофотометре «Nanodrop 2000C» при длине волны 260 нм. Отношения A260/A280 и A260/A230 были 1,9 и 2,0, соответственно, что свидетельствовало о высоком качестве препарата и низкой загрязненности изолированных образцов белковыми компонентами и вторичными

метаболитами. Препарат РНК использовали для выделения мРНК методом обогащения на олиго-dT целлюлозе при помощи MagJET mRNA Enrichment Kit (Thermo scientific Cat. No. # K2811) согласно протоколу производителя.

1	ATGTCGTCTCACGGCTCCCATGACGGGGCCAGCACCGAGAAGCATCTTGCTACTCATGACATTGCGCCCACCCACGACGCCATCAAGATA	
	M S S H G S H D G A S T E K H L A T H D I A P T H D A I K I	90
31	GTGCCCAAGGGCCATGGCCAGACAGCCACAAAGCCCGGTGCCCAAGAGAAGGAGGTCCGCAACGCCGCCCTATTTGCGGCCATCAAGGAG	
	V P K G H G Q T A T K P G A Q E K E V R N A A L F A A I K E	180
61	TCCAATATCAAGCCCTGGAGCAAGGAGTCCATCCACCTCTATTTCGCCATCTTCGTCGCCTTTTGTTGTGCATGCGCCAACGGTTACGAT	
	S N I K P W S K E S I H L Y F A I F V A F C C A C A N G Y D	270
901	GGTTCACTCATGACCGGAATCATCGCTATGGACAAGTTCCAGAACCAATTCCACACTGGTGACACTGGTCCTAAAGTCTCTGTCATCTTT	
	G S L M T G I I A M D K F Q N Q F H T G D T G P K V S V I F	360
121	TCTCTCTATACCGTTGGTGCCATGGTTGGAGCTCCCTTCGCTGCTATCCTCTCTGATCGTTTTGGCCGTAAGAAGGGCATGTTCATCGGT	
	S L Y T V G A M V G A P F A A I L S D R F G R K K G M F I G	450
151	GGTATCTTTATCATTGTCGGCTCCATTATTGTTGCTAGCTCCTCCAAGCTCGCTCAGTTTGTCGTTGGCCGCTTCGTTCTTGGCCTCGGT	
	G I F I I V G S I I V A S S S K L A Q F V V G R F V L G L G	540
181	ATCGCCATCATGACCGTTGCTGCCCCGGCCTACTCCATCGAAATCGCCCCTCCTCACTGGCGCGGCCGCTGCACTGGCTTCTACAACTGC	
	I A I M T V A A P A Y S I E I A P P H W R G R C T G F Y N C	630
211	GGTTGGTTCGGAGGTTCGATTCCTGCCGCCTGCATCACCTATGGCTGCTACTTCATTAAGAGCAACTGGTCATGGCGTATCCCCTTGATC	
	G W F G G S I P A A C I T Y G C Y F I K S N W S W R I P L I	720
241	CTTCAGGCTTTCACGTGCCTTATCGTCATGTCCTCCGTCTTCTTCCTCCCAGAATCCCCTCGCTTCCTATTTGCCAACGGCCGCGACGCT	
	L Q A F T C L I V M S S V F F L P E S P R F L F A N G R D A	810
271	GAGGCTGTTGCCTTTCTTGTCAAGTATCACGGCAACGGCGATCCCAATTCCAAGCTGGTGTTGCTCGAGACTGAGGAGATGAGGGACGGT	
	E A V A F L V K Y H G N G D P N S K L V L L E T E E M R D G	900
301	ATCAGGACCGACGGTGTCGACAAGGTCTGGTGGGATTACCGCCCGCTCTTCATGACCCACAGCGGCCGCTGGCGCATGGCCCAGGTGCTC	
	I R T D G V D K V W W D Y R P L F M T H S G R W R M A Q V L	990
331	ATGATCTCCATCTTTGGCCAGTTCTCCGGCAACGGTCTCGGTTACTTCAATACCGTCATCTTCAAGAACATTGGTGTCACCAGCACCTCC	
	M I S I F G Q F S G N G L G Y F N T V I F K N I G V T S T S	1080
361	CAACAGCTCGCCTACAACATCCTCAACTCCGTCATCTCCGCTATCGGTGCCTTGACCGCCGTCTCCATGACTGATCGTATGCCCCGCCGC	
	Q Q L A Y N I L N S V I S A I G A L T A V S M T D R M P R R	1170
391	GCGGTGCTCATTATCGGTACCTTCATGTGCGCCGCTGCTCTTGCCACCAACTCGGGTCTTTCGGCTACTCTCGACAAGCAGACTCAAAGA	
	A V L I I G T F M C A A A L A T N S G L S A T L D K Q T Q R	1260
421	GGCACGCAAATCAACCTGAACCAGGGTATGAACGAGCAGGATGCCAAGGACAACGCCTACCTCCACGTCGACAGCAACTACGCCAAGGGT	
	G T Q I N L N Q G M N E Q D A K D N A Y L H V D S N Y A K G	1350
451	GCCCTGGCCGCTTACTTCCTCTTCAACGTCATCTTCTCCTTCACCTACACTCCCCTCCAGGGTGTTATTCCCACCGAGGCTCTCGAGACC	
	A L A A Y F L F N V I F S F T Y T P L Q G V I P T E A L E T	1440
481	ACCATCCGTGGCAAGGGTCTTGCCCTTTCCGGCTTCATTGTCAACGCCATGGGCTTCATCAACCAGTTCGCTGGCCCCATCGCTCTCCAC	
	T I R G K G L A L S G F I V N A M G F I N Q F A G P I A L H	1530
511	AACATTGGCTACAAGTACATCTTTGTCTTTGTCGGCTGGGATCTTATCGAGACCGTCGCTTGGTACTTCTTTGGTGTCGAATCCCAAGGC	
	N I G Y K Y I F V F V G W D L I E T V A W Y F F G V E S Q G	1620
541	CGTACCCTCGAGCAGCTCGAATGGGTCTACGACCAGCCCAACCCCGTCAAGGCCTCCCTAAAAGTCGAAAAGGTCGTCGTCCAGGCCGAC	
	R T L E Q L E W V Y D Q P N P V K A S L K V E K V V V Q A D	1710
571	GGCCATGTGTCCGAAGCTATCGTTGCTTAG	
	G H V S E A I V A #	1740

#-указывает на стоп-кодон; левый столбик указывает на порядок аминокислот, а правый на порядок нуклеотидов.

Рисунок 32 – Нуклеотидная и предполагаемая аминокислотная последовательность мембранного переносчика целлодекстринов CDT1

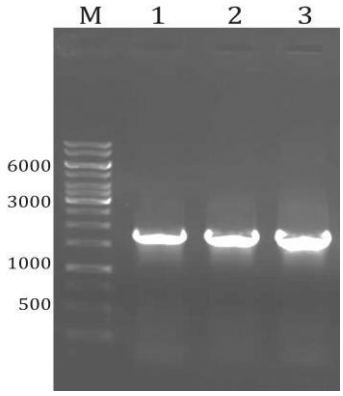


М - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-2-препарат РНК осажденный LiCl.

Рисунок 33 – Препараты нуклеиновых кислот, выделенных из мицелия гриба *Neurospora crassa*

Для выделения гена, кодирующего мембранный транспортер целлодекстринов CDT1 гриба *Neurospora crassa*, нами были сконструированы олигонуклеотидные праймера на основе данных о первичной структуре кДНК гена *cdt1*, имеющихся в электронной базе данных GenBank. Последовательности этих олигонуклеотидных праймеров представленны в таблице 4.

Препарат мРНК, приготовленный как описано выше, был подвергнут реакции ОТ-ПЦР с данными праймерами. Продукты ПЦР анализировали в 0,8 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализацией в проходящем УФ-свете с помощью транслюминатора. В результате был амплифицирован фрагмент ДНК размером 1757 пар нуклеотидов, соответствующий длине кДНК гена *cdt1* (рисунок 34).



M - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-3-продукты последовательных реакций ОТ- ПЦР.

Рисунок 34 – Амплификация кДНК гена *cdt1* гриба *Neurospora crassa*

3.3.1.3 Создание рекомбинантной ДНК-конструкции для экспрессии гена *cdt1*

В последующих экспериментах, для экспрессии гена *cdt1* гриба *Neurospora crassa* в бактериях нами также был выбран вектор pET28c (рисунок 35). Для создание рекомбинантной конструкции кДНК ген *cdt1* клонировали в плазмиду pET28c по сайтам рестрикции *BamH*I и *Hind*III, в результате чего была создана рекомбинантная плазмида pET28c/*cdt1*. После гидролиза рестриктазами векторную ДНК и кДНК ген *cdt1* лигировали с помощью Т4 ДНК-лигазы. Продукт лигирования трансформировали в *E.coli* штамма JM109 для наработки рекомбинантной плазмиды. Селекцию клонов проводили на агаризованной среде LB с канамицином (50 мкг/мл). Далее плазмидные ДНК клонов, выделенные в соответствии с протоколом набора «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» (Thermo Scientific #K0503), были использованы для тестирования на наличие гена *cdt1* с помощью рестрикционного и ПЦР анализов с использованием ген специфических праймеров Dir_*cdt1*_*BamH*I и Rev_*cdt1*_*Hind*III. Результаты тестирования проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле (Рисунок 36).

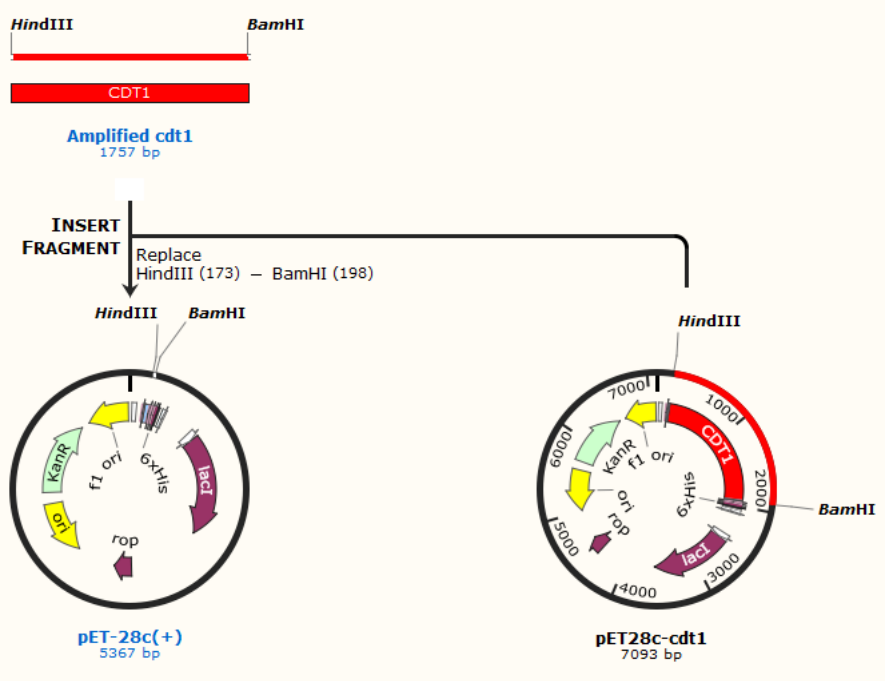
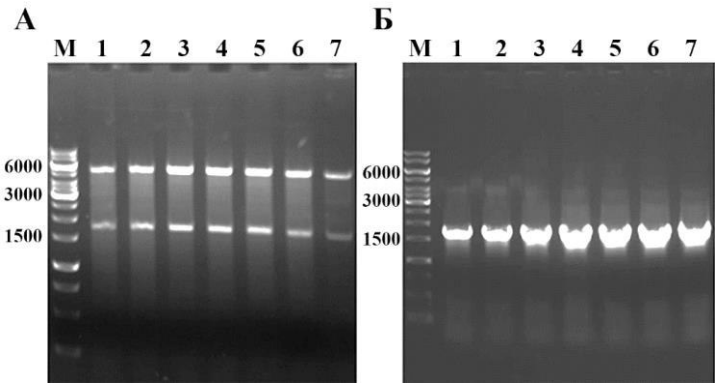


Рисунок 35 – Карта рекомбинантной плазмиды pET28c/*cdt1*

Результаты рестрикционного анализа плазмид представлены на рисунке 36А. Как видно из рисунка, клоны, содержащие плазмиды pET28c/*cdt1*, при обработке эндонуклеазами *Hind*III и *BamH*I на 1% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной около 5,4 т.п.н. и 1.7 т.п.н. По размеру первая полоса соответствовала длине плазмиды pET28c без вставки, а вторая длине гена *cdt1*. При проведении ПЦР анализа с использованием ген-специфических праймеров и плазмидной ДНК, выделенных из трансформантов, фрагменты, обнаруженные в результате агарозного гель-электрофореза, полностью соответствовали длине клонированного гена *cdt1* (рисунок 36Б).



А) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/*cdt1*; Б) ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/*cdt1*. М - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-7 - клоны.

Рисунок 36 – Анализ клонов, трансформированных с pET28c/*cdt1* штаммов *E.coli* на наличие рекомбинантной плазмиды

В результате скрининга удалось идентифицировать 7 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Определение нуклеотидной последовательности показала полное соответствие первичной структуры гена, ранее опубликованной нуклеотидной последовательности гена *cdt1* гриба *Neurospora crassa* [192, P. 85].

Поиск белков, гомологичных изучаемому белку CDT1, на основе транслированной нуклеотидной последовательности с помощью BLAST на веб-сайте NCBI, показал, что клонированный кДНК ген CDT1 относится к главной и независимой группе вторичных мембранных транспортеров сахаров надсемейства MFS (Major Facilitator Superfamily). Гомологи CDT1 найденные путем выравнивания аминокислотных последовательностей белка с ферментами, для которых известны их первичные структуры, приведены в таблице 8.

Как видно из данных, представленных в таблице 8, аминокислотная последовательность, транслированная на основе нуклеотидной последовательности клонированного нами гена *cdt1* показывает высокую степень гомологии к известным грибным мембранным транспортерам сахаров надсемейства MFS.

Таблица 8 – Значения Blast-анализа для *cdt1* кДНК гриба гриба *Neurospora crassa*

Регистрационный номер Genbank	Организм и ген	Score	E-value	Идентичность (%)
XP_963801.1	MFS lactose permease [*Neurospora crassa* OR74A]	1197	0.0	100%
KOP44236.1	Lactose permease [*Madurella mycetomatis*]	835	0.0	71%
XP_001268541.1	MFS lactose permease, putative [*Aspergillus clavatus NRRL 1*]	745	0.0	61%
EKV17389.1	MFS lactose permease, putative [*Penicillium digitatum PHI26*]	739	0.0	65%
CRG88476.1	Lactose permease [*Talaromyces islandicus*]	739	0.0	62%

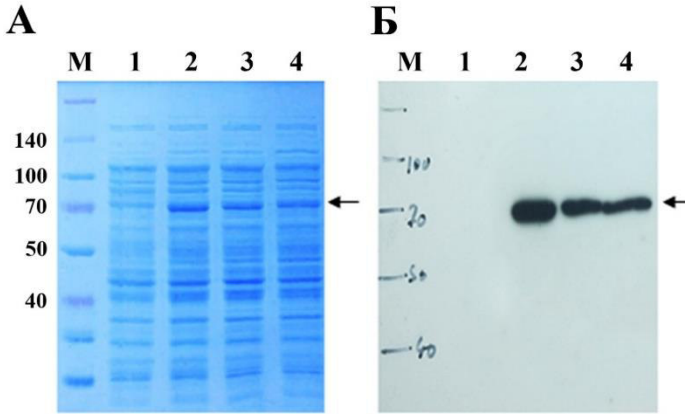
3.3.1.4 Экспрессия рекомбинантного белка мембранного переносчиков целлодекстринов гриба *Neurospora crassa* в *E. coli*

Несмотря на то, что последовательность аминокислот, установленная на основе нуклеотидной последовательности *cdt1* гомологичны искомому ферменту, необходимо было продемонстрировать, кодирует ли на самом деле этот ген мембранный переносчик целлодекстринов гриба *N. crassa*. Для этого мы выбрали экспрессионную систему *E.coli*. Выбор был сделан на основании того, что *E.coli* не обладают целлюлолитической активностью.

Для идентификации продуктов гена *cdt1* в клетках *E. coli* использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7. Для синтеза мембранного переносчика целлодекстринов гриба *N. crassa* в бактериальных клетках нами был выбран экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta(DE3), разновидность штамма К-12. Этот штамм содержит в хромосоме копию гена, кодирующий Т7 РНК полимеразу под контролем *lacUV5*-промотора. Rosetta(DE3) создана на основе штамма BL21 lacZY для увеличения экспрессии эукариотических белков содержащих редко используемые в *E. coli* кодоны. Этот штамм содержит гены тРНК к следующим кодонам: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA в устойчивых к хлорамфениколу плазмиде.

Экспрессию гена *cdt1* в трансформированных клетках *E. coli* выявляли с помощью SDS-ПААГ электрофореза и иммуноблоттинга с моноклональными 6xHis-tag антителами. Отбор проб для анализа проводили до и после индукции с ИПТГ в течение 16 часов (ночная культура). Электрофорез белковых образцов, приготовленных кипячением клеточных лизатов в 2х образцовом буфере, проводили в 10% ПААГ в Трис-глицинный буфере pH 8.3 с добавлением антиоксиданта при 12 V/см^2.

Как видно из рисунка 37А, трансформированные клетки, инкубированные в присутствии ИПТГ, синтезировали белок с молекулярной массой около 70 кДа, что соответствует молекулярной массе CDT1, соответственно. В отсутствие индуктора накопление белка с сответствующей молекулярной массой не происходило. Что свидетельствовало об эффективной экспрессиии данного гена.



А) SDS-ПААГ электрофорез клеточного экстракта *E. coli* штамма Rosetta(DE3); Б) Вестерн блоттинг клеточного экстракта *E. coli* штамма Rosetta(DE3). М-маркер молекулярной массы белков (кДа); 1-экстракт *E. coli* несущий pET28c/*cdt1* без индукции; 2-4 - экстракт *E. coli* несущий pET28c/*cdt1* после 16 ч индукции с ИПТГ.

Рисунок 37 – Экспрессия кДНК гена мембранного транспортера целлодекстринов гриба *N. crassa* в *E.coli*

В последующих экспериментах для анализа экспрессии гена мембранного переносчика целлодекстринов гриба *N. crassa* белок из SDS-ПААГ геля были

перенесены на PVDF мембрану и инкубированы с моноклональными 6xHis-tag антителами. Экспериментальные данные анализа экспрессии изучаемых рекомбинантных белков с помощью иммуноблоттинга показали, что белок, полученный из неиндуцированных штаммов *E.coli,* не имеют белковой полосы с искомой массой. Тогда как белки, собранные после индукции ИПТГ, показывают четкую экспрессию рекомбинантного белка с молекулярной массой около 70 кДа, что соответствует размеру CDT1 соответственно.

На данном этапе работы нами был успешно экспрессирован ген мембранного переносчика целлодекстринов гриба *N. crassa* в *E.coli* под контролем промотора T7 [244]. Результаты SDS-ПААГ электрофореза и иммуноблоттинга показали, что CDT1 является основным белком, вырабатываемый в стимулированной с ИПТГ культуре *E. coli*, с соответствующей молекулярной массой теоретически предсказанной на основе аминокислотной последовательности CDT1 гриба *N. crassa*, извлеченной из базы данных NCBI.

3.3.1.5 Очистка рекомбинантного белка CDT1 из *E. coli* до гомогенного состояния

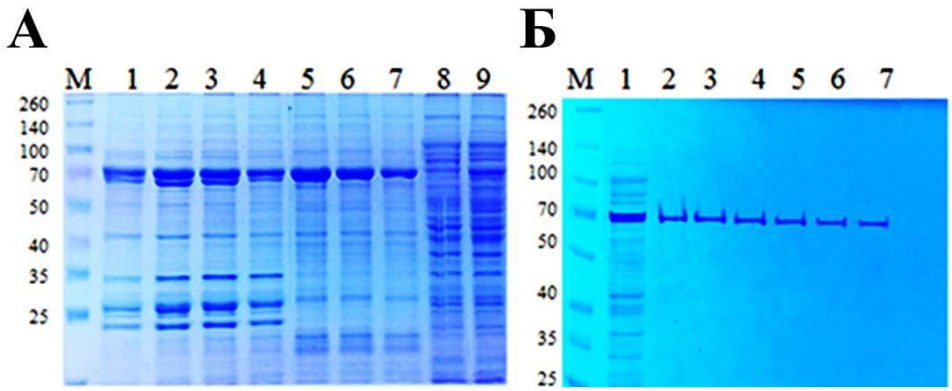
Так как для экспрессии кДНК гена мембранного переносчика целлодекстринов гриба *N. crassa* в *E.coli* был выбран вектор pET28c (Clontech), экспрессированный рекомбинантный белок содержал шесть идентичных гистидиновых остатков на С-конце, которые действуют как сайт-связывания металлов для очистки и экспрессии белков. В связи с этим рекомбинантный белок с 6xHis-концом был очищен методом металло-хелатной аффинной хроматографии на никель-ионных колонках и элюирован из металл-хелатной колонки с помощью имидазола в градиенте 20-500мМ (см. раздел «Материалы и методы исследования») с регистрацией оптической плотности на длине волны 280 нм. Следует отметить, что все процедуры хроматографической очистки проводили при температуре 0-4°С. На каждом этапе выделения и очистки отбирали аликвоты для электрофоретического анализа белков. Белковые образцы готовили кипячением в 2X буфере для образцов (2X:125 мМ Tris-HCl pH 6.8, 10% β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0.02% бромфенолового синего, 20% глицерина) в течении 5 мин при 100°С. Степень очистки полученного белка определяли с помощью гель-электрофореза по Лэммли с последующим окрашиванием раствором Coomassie G-250 (рисунок 38).

Как видно из представленных данных, рекомбинантный белок CDT1 был очищен до гомогенного состояния с помощью никель-хелатной хроматографии и дополнительной очистки на гепариновой колонке.

3.3.1.6 Анализ рекомбинантного белка CDT1 с помощью тандемной масс-спектрометрии с использованием nano-LC/MS/MS технологии

Для идентификации и классификации рекомбинантного фермента, полосы на гель-электрофореграмме, соответствующие изучаемому белку, вырезали и обрабатывали трипсином, в результате чего были получены пептидные

«фингерпринты» белков. Далее смесь полученных пептидов анализировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии в лаборатории «Протеомики и эпигенетики» НИИ Густава-Розы (Франция).



А) Очистка рекомбинантного белка CDT1 на никель-ионных колонках. М-маркер молекулярной массы белков (кДа); 1-7 - фракции очищенных белков; 8 -неиндуцированный клеточный лизат; 9 - индуцированный клеточный лизат; Б) Дополнительная очистка на гепариновой колонке для рекомбинантного белка CDT1. 1-объединенные фракции очищенных белков на никель-ионных колонках, 1-7- фракции очищенных белков на гепариновой колонке.

Рисунок 38 – Очистка рекомбинантного белка CDT1

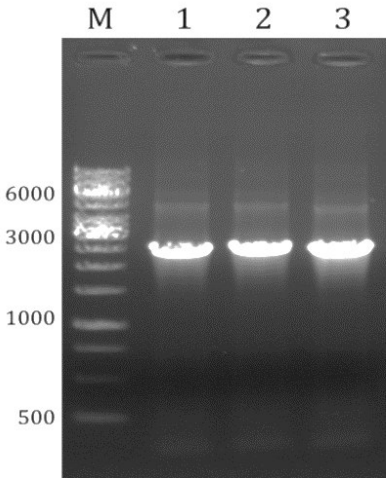
Поиск белков, гомологичных изучаемым белкам был проведен в базе данных SwissProt (UniProtKB) с помощью программы «BLAST2» (http://cn.expasy.org/tools). Результаты MASCOT поиска показали достоверную степень (score 569) идентичности рекомбинантного белка CDT1 гриба *N. crassa* к мембранным переносчикам сахаров надсемейства главных переносчиков.

На данном этапе работы нами был успешно экспрессирован ген *cdt1* мембранного переносчика целлодекстринов гриба *N. crassa* в *E.coli* под контролем промотора T7. Результаты ДСН-ПААГ электрофореза показали, что продукт кДНК гена CDT1 является основным белком, вырабатываемый в стимулированной ИПТГ культуре *E. coli*, с соответствующей молекулярной массой, теоретически предсказанной на основе аминокислотной последовательности данного фермента, извлеченной из базы данных NCBI. Изучение аминокислотных последовательностей предполагаемого рекомбинантного белка при помощи MALDI-TOF и их анализа с использованием NCBI BLAST показали, что белок CDT1 - мульти домен транспортеров сахаров, соответственно.

3.3.2 Создание конструкции p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*eGFP*-tCYC1-KanMX4-*HO*

Для создания дрожжевого экспрессионного вектора использовали плазмиду p*HO*-poly-KanMX4-*HO*, содержащий селективный маркер KanMX4 и два

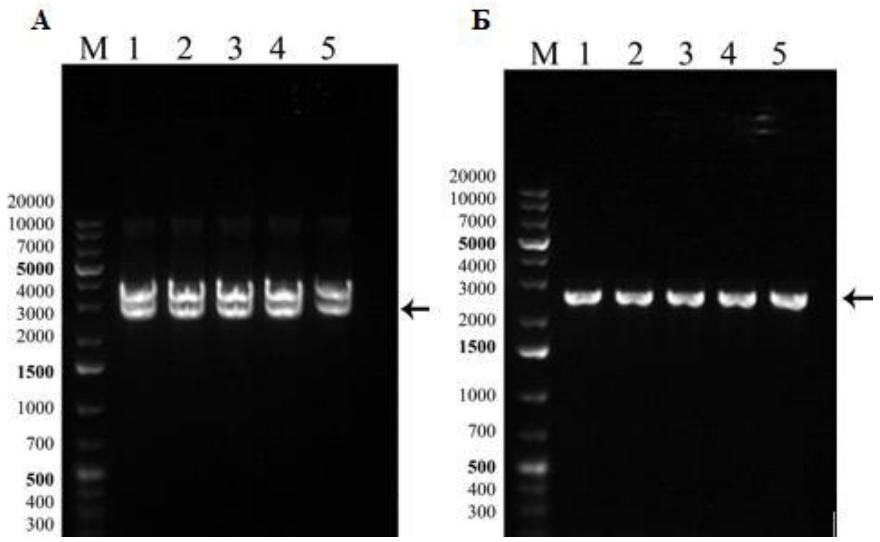
фрагмента *HO* гена для интеграции в *HO* локус генома дрожжевой клетки. В качестве источника последовательности, кодирующию β-глюкозидазу (*tabgl1*) гриба *Thermoascus aurantiacus* использовали созданную нами рекомбинантную плазмиду pET28c/*tabgl1* (таблица 3). С использованием в качестве матрицы pET28c/*tabgl1* плазмиду амиплифицировали ген *tabgl1* с помощью ПЦР с праймерами Dir_*bgl1_Bgl*II и Rev_*bgl1_Spe*I (рисунок 39; таблица 4), содержащие сайты рестрикции *Bgl*II и *Spe*I, соответственно. Полученные продукты ПЦР использовали для последующего клонирования в созданную нами конструкцию pBSK-3xFLAG-cMYC-HA-MCS по сайтам рестрикции *Bgl*II и *Spe*I для получения последовательности, кодирующий гибридный белок с 3xFlag-эпитопом на N-конце. Полученная плазмида pBSK-3xFLAG-*tabgl1* была трансформирована в компетентный штамм *E. coli* JM109 для наработки плазмидной ДНК. Селекцию трансформантов проводили на селективной среде LB с ампицилином. С индивидуальных колоний выделяли мини препараты плазмид, которые в дальнейшем были проверены на наличие вставки с помощью ПЦР и рестрикционного анализа.



M- маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-3-продукты ПЦР.

Рисунок 39 – Амплификация кДНК гена β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus*

В результате плазмиды, выделенные из трансформированных рекомбинантным вектором pBSK-3xFLAG-*tabgl1* клеток *E. coli,* при обработке эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и Spe*I* на 1% агарозном геле дали четко выраженные две полосы с длиной около 3 т.п.н. и 2,5 т.п.н. Первая из полос соответствовала длине плазмиды без вставки, а вторая длине гена *tabgl1*. Также нами был проведен ПЦР анализ с использованием ген-специфических праймеров и плазмидных ДНК, выделенных из трансформантов. Фрагменты, обнаруженные в результате агарозного гель-электрофореза полностью соответствовали длине клонированного гена *bgl1* (рисунок 40).



А) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pBSK-3xFLAG-*tabgl1*; Б) ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pBSK-3xFLAG-*tabgl1*; М - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-5 - клоны.

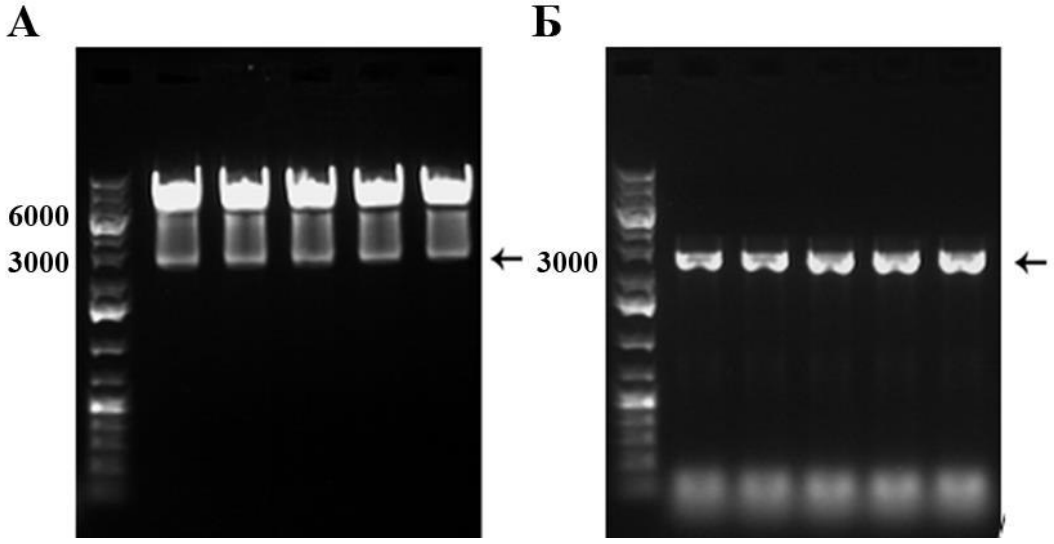
Рисунок 40 – Анализ клонов, трансформированных pBSK-3xFLAG-*tabgl1*, на наличие вставки искомого гена

Одним из определяющих моментов в работе по получению штаммов дрожжей, продуцирующих чужеродные белки – это выбор дрожжевого промотора, способного обеспечить высокую продуктивность и гибкость всей системы в целом. В нашей работе для эффективной экспрессии кДНК гена *tabgl1* были использованы сильные дрожжевые конститутивные промоторы TEF1 и PGK1 дрожжевого вектор pCEV-G1-Ph, обеспечивающий высокий уровень синтеза соответствующей мРНК.

Для обеспечения экспрессии гибридного белка в дрожжевой системе фрагмент, полученный в результате рестрикции плазмиды pBSK-3xFLAG-*tabgl1* по сайтам *Not*I и *Spe*I, содержащий 3xFLAG-*tabgl1* кассету, клонировали в pCEV-G1-Ph вектор под контроль TEF1 промотора. Продукт лигирования трансформировали в JM109 штамм *E. coli*. Для идентификации рекомбинантного вектора проводили ПЦР скрининг и рестрикционный анализ (рисунок 41). В результате рестрикции на агарозном геле было выявлено два фрагмента ДНК с ожидаемыми размерами около 6,5 т.п.н и 2,7 т.п.н, соответствующие длине корпуса плазмиды без вставки и длине 3xFLAG-*tabgl1* кассеты. В результате скрининга удалось идентифицировать 5 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Определение нуклеотидной последовательности показал полное соответствие нуклеотидной последовательности гена *tabgl1*.

Далее, для обеспечения экспрессии CDT1 белка в дрожжевой системе, фрагмент, полученный путем гидролиза созданной нами плазмиды pET28c/*cdt1* по сайтам рестрикции *Hind*III и *BamH*I, клонировали в pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1* под контроль PGK1 промотора (схема клонирования показана на рисунке

42). Продукт лигирования трансформировали в JM109 штамм *E. coli*. Для идентификации рекомбинантного вектора проводили рестрикционный анализ плазмид, выделенных из клеток, отобранных на селективной среде с ампициллином.



А) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1*; Б) ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1*; М - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-5 - клоны.

Рисунок 41 – Анализ клонов, трансформированных pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1*, на наличие вставки искомого гена

В результате рестрикции на агарозном геле было выявлено четко выраженные две полосы с длиной 9 т.п.н. и 1,7 т.п.н.. Первая из полос соответствовала длине плазмиды pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1*, а вторая длине гена *cdt1* (рисунок 43А). В результате нами была получена рекомбинантная плазмида pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1*•*cdt1*, содержащая последовательности кДНК генов TaBGL1 гриба *Thermoascus aurantiacus* и CDT1 гриба *Neurospora crassa.*

Далее, для определения мембранной локализации CDT1 белка с помощью микроскопического выявления флуоресценции на основе GFP фильтра, последовательность гена CDT1 должна быть слита с последовательностью гена зелёного флуоресцирующего белка. Для этого с использованием в качестве матрицы рекомбинантной плазмиды pEGFP-C3 нами амиплифицирован ген eGFP с помощью полимеразной цепной реакции с применением праймеров Dir_*eGFP_Hind*III и Rev_*eGFP_Nhe*I (таблица 4), содержащие сайты рестрикции *Hind*III и *Nhe*I соответственно. Анализ длины полученного продукта проводили при помощи электрофореза в 1%-ом агарозном геле. Продукты ПЦР использовали для последующего клонирования в созданную нами плазмиду pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1*•*cdt1-egfp* по сайтам рестрикции *Hind*III и *Nhe*I для получения гибридного белка CDT1 с С-концевой

последовательностью зелёного флуоресцирующего белка, и лигировали с использованием ДНК-лигазы фага Т4.

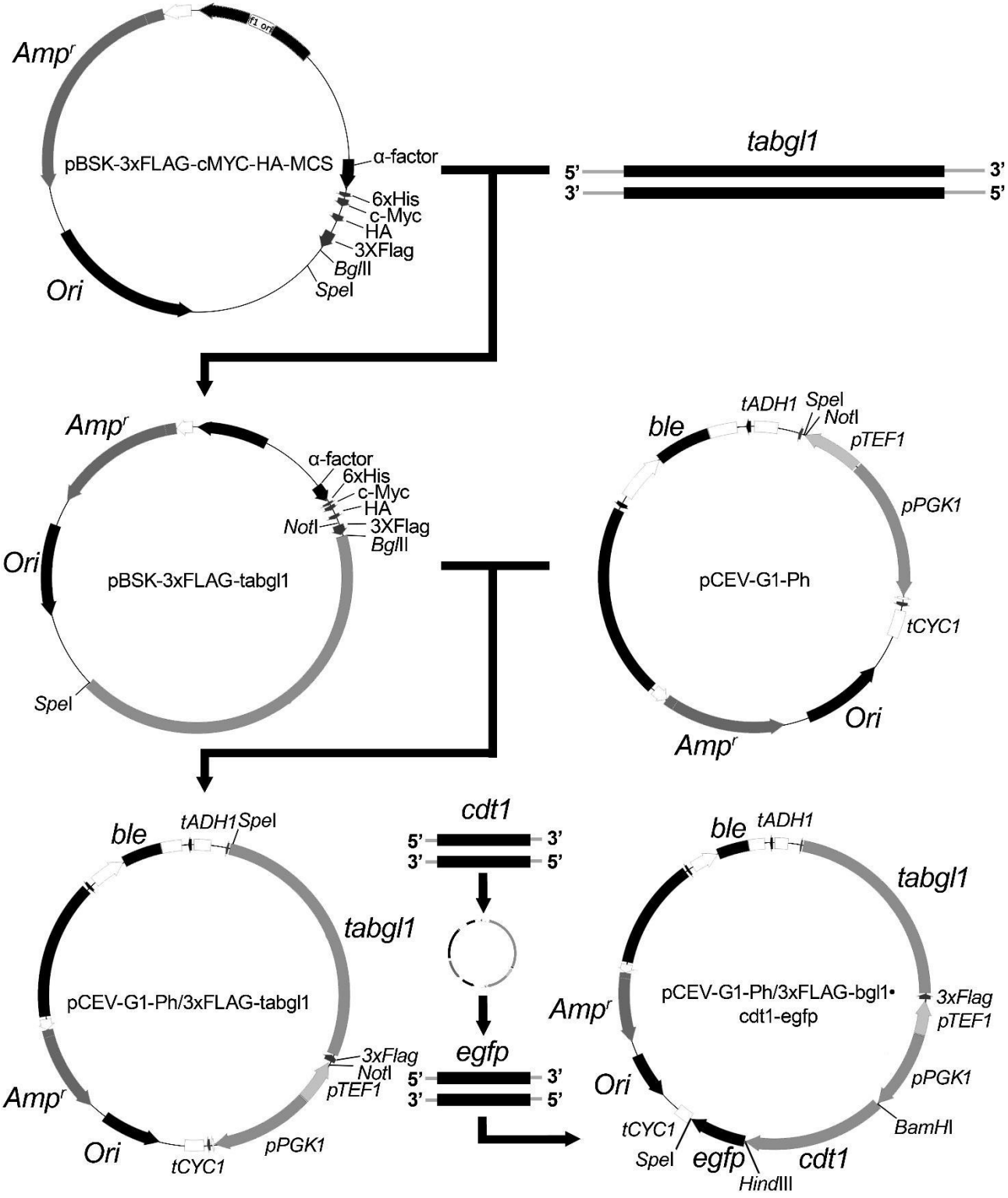
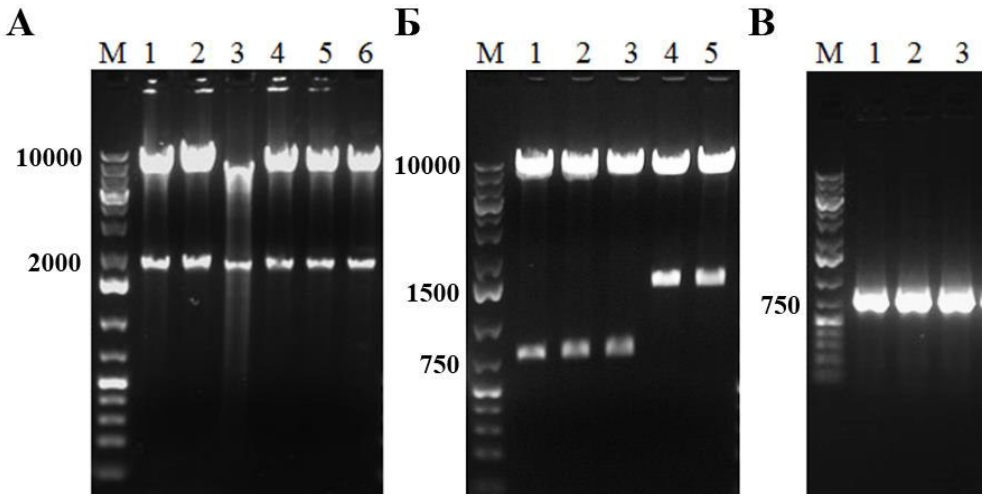


Рисунок 42 – Схема конструкции рекомбинантной плазмиды pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*bgl1•cdt1-egfp*

Далее, продукт лигирования был трансформирован в компетентный штамм *E. coli* JM109 для наработки плазмидной ДНК. С индивидуальных колоний, выросших на селективной среде LB с ампицилином выделяли мини препараты плазмид, которые в дальнейшем были проверены на наличие вставки с помощью рестрикционного анализа по сайтам *Hind*III и *Nhe*I. В результате рестрикции на агарозном геле выявлено два фрагмента ДНК с ожидаемыми размерами около 0,7 и 11 т.п.н. что соответствует размерам eGFP и корпуса вектора без вставки соответственно (рисунок 43Б). Также нами был проведен ПЦР анализ с использованием ген-специфических праймеров (таблица 4) и плазмидных ДНК, выделенных из трансформантов, в качестве матрицы. Фрагменты, обнаруженные в результате агарозного гель-электрофореза полностью соответствовали длине клонированного гена (рисунок 43В).



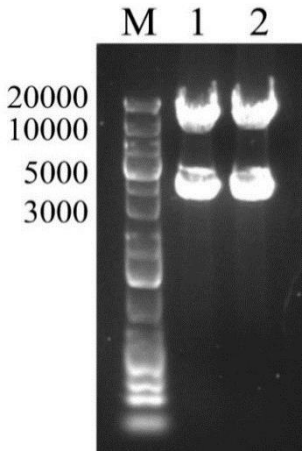
А) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1•cdt1*; Б) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1•cdt1-egfp*; В) ПЦР анализ с праймерами на *egfp* ген. М - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-6 - клоны.

Рисунок 43 – Анализ клонов на наличие вставок *cdt1* и *egfp* генов

В результате проведенных работ нами была получена плазмида pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1•cdt1-egfp* несущая последовательности гибридных белков TaBGLI и CDT1 с N-концевым Flag-эпитопом и С-концевой последовательностью зелёного флуоресцирующего белка, соответственно.

Далее для создания интегрального вектора, с pCEV-G1-Ph/3xFLAG-*tabgl1•cdt1-egfp* вектора амплифицировали фрагмент, содержащий 3xFLAG-*tabgl1•cdt1-egfp*, с применением праймеров Dir_ADH1t_*Pme*I и Rev_CYCt_*Asc*I (таблица 4), и обработали по сайтам рестрикции ферментов *Asc*I и *Pme*I. Продукт рестрикции клонировали в плазмиду p*HO*-poly-KanMX4-*HO* предварительно обработанный по сайтам рестрикции ферментов *Asc*I и *Sma*I и лигировали ДНК-лигазой фага Т4. Продукты лигирования трансформировали в электрокомпетентные клетки штамма JM109 методом электропорации.

Скрининг трансформантов проводили на селективной агаризованной среде LB с ампициллином. Плазмиды, выделенные с отобранных на селективной среде трансформантов, проверяли на наличие вставок методом рестрикции ферментами *Nde*I и *Xba*I (рисунок 44). Схема клонирования показана на рисунке 45.



M - маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1-2 - клоны.

Рисунок 44 – Анализ клонов на наличие вставки искомой рекомбинантной кассеты

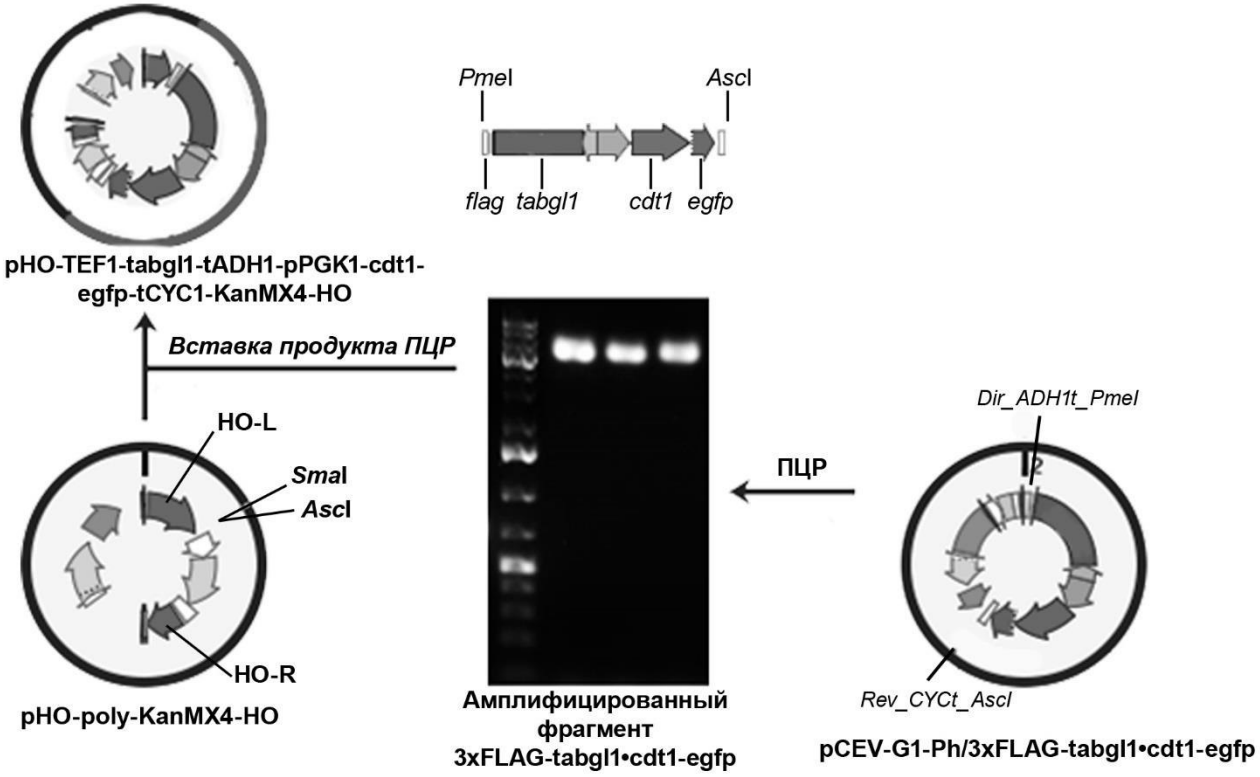


Рисунок 45 – Схема конструкции рекомбинантной плазмиды *pHO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO*

Было показано, что в результате рестрикции эндонуклеазами выщепляются фрагменты с длиной приблизительно 3,3 т.п.н., соответствующий длине вектора без гомологичных участков к *HO* локусу генома дрожжей, а также фрагмент в 9,7 т.п.н., соответствующий размеру p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO* кассеты. Анализ клонов, трансформированных полученной нами плазмидой, на наличие вставки показал, что нами действительно был сконструировани интегральный вектор *pHO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO,* содержащий последовательности, кодирующие гибридные белки 3xFlag•*tabgl1* и *cdt1-egfp,* с KanMX4 геном устойчивости к генетицину и *HO* локусами для обеспечения интеграции в геном дрожжевой клетки.

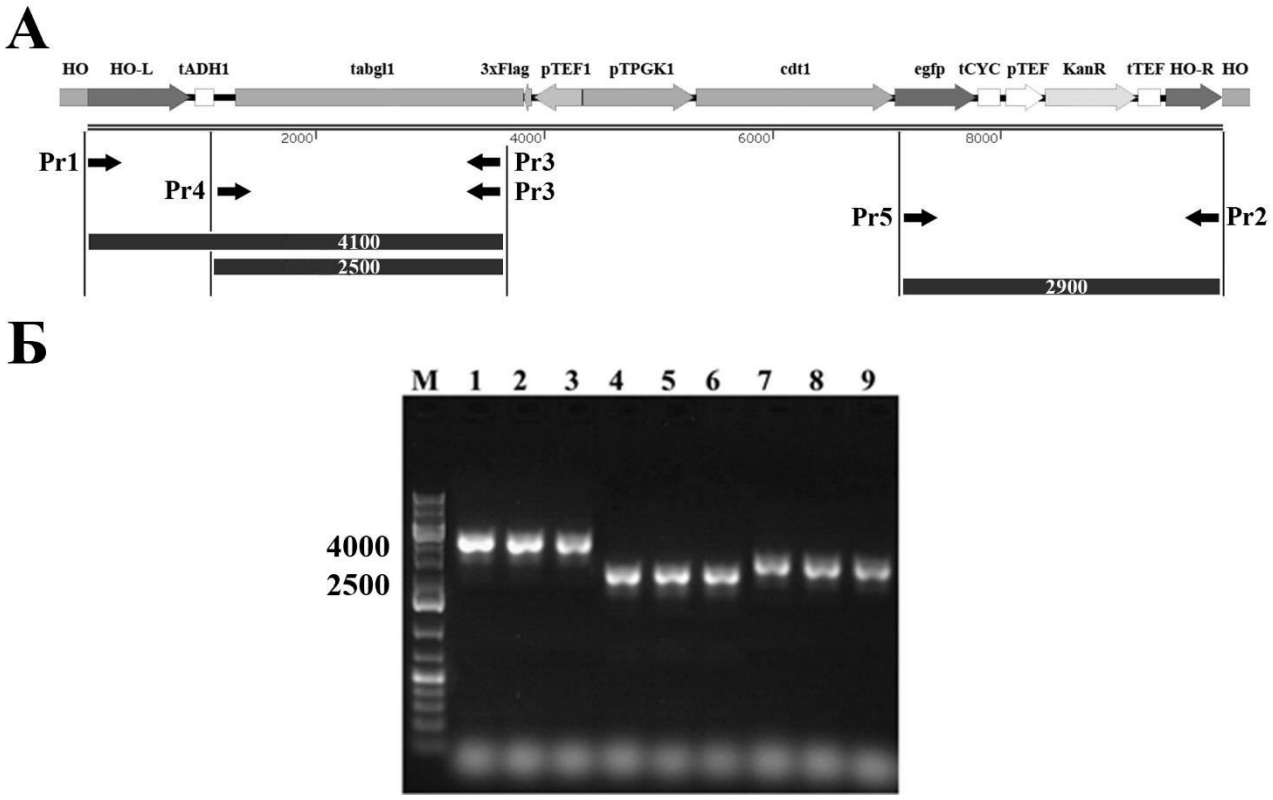
3.3.3 Создание промышленного штамма Y-2034 *Saccharomyces cerevisiae* с генами *tabgl1* гриба *Thermoascus aurantiacus* и *cdt1* гриба *Neurospora crassa*

Для создания промышленного штамма Y-2034 *S. cerevisiae*, коэкспрессирующий гены *tabgl1* и *cdt1* (Y2034/*tabgl1•cdt1-egfp* штамм), полученный нами экспрессионный вектор *pHO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO*, несущий кДНК гены *tabgl1* (без сигнального пептида) и *cdt1,* был линеаризирован ферментами рестрикции *Nde*I и *Xba*I для оптимизации интеграции в геном, и использован для трансформации в промышленный штамм Y-2034 *S.cerevisiae.* Скрининг трансформантов проводили в агаризованной среде YPD в присутствии антибиотика генетицина (G418). Хромосомная интеграция экспрессионной кассеты с вышеназванными генами и правильная ориентация в геноме дрожжей была проверена методом ПЦР с применением разработанных нами специфичных пар праймеров, представленных в таблице 4, и геномной ДНК в качестве матрицы, выделенных с трансформированных дрожжевых клеток (рисунок 46А).

Создание праймеров для проверки интеграции конструированной нами кассеты основана на том, что один из ПЦР-праймеров (Pr1) комплементарен участку хромосомной ДНК, прилегающему к одному из гомологичных участков ДНК (в нашем случае, участок хромосомы, прилегающий к HO-L). Другой - к участку нуклеотидной последовательности интегрировавшего вектора (например Pr4, комплементарен к 3’-концу гена β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus*). При встраивании последовательности мишени в случайный сайт ожидаемый продукт амплификации образовываться не будет, а при сайт-специфической интеграции в результате ПЦР-амплификации образуется фрагмент ожидаемого размера.

В результате ПЦР с праймерами Pr1 и Pr3, гомологичные к участку хромосомы фланкирующий HO-L локус и к 5’-концу гена β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus*, был амплифицирован ожидаемый фрагмент ДНК размером около 4,1 т.п.н. (рисунок 46Б, 1-3). При использовании праймеров Pr3 (комплементарен к 5’-концу последовательности гена β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus*) и Pr4 был обнаружен только один фрагмент длиной 2500 п.н (рисунок 46Б, 4-6), указывающий на наличие гена β-глюкозидазы гриба *Thermoascus aurantiacus* в интегрированной кассете. В результате ПЦР с праймерами Pr2 (гомологичного к

участку хромосомы фланкирующий HO-R локус) и смыслового ген специфического праймера Pr5 (комплементарен к 5’-концу eGFP) был амплифицирован ожидаемый фрагмент ДНК размером около 2900 п.н (рисунок 46Б, 7-8). Результаты этих экспреиментов подтверждают эффективную интеграцию конструированной нами экспрессионной рекомбинантной кассеты p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO* в *HO* локус генома *S*. *cerevisiae*.



А) линейная форма p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO* кассеты с картой праймеров; Б) Продукты ПЦР, полученные на матрице геномной ДНК с применением Pr1-Pr5 праймеров. М - ДНК маркер; 1-3 - ПЦР продукты полученные с применением Pr1 и Pr4; 4-6 - ПЦР продукты, полученные с применением Pr3 и Pr4; 7-9 - ПЦР продукты, полученные с применением Pr2 и Pr5.

Рисунок 46 – Анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO*

Таким образом, нами был получен промышленный рекомбинантный Y-2034/*bgl1•cdt1*-*egfp* штамм, содержащий в геномной хромосоме гены *tabgl1* гриба *Thermoascus aurantiacus* и *cdt1* гриба *Neurospora crassa* [245-247]. Данный штамм обеспечивает непрерывную экспрессию гена внутриклеточной формы β-глюкозидазы гриба *Thermoascus aurantiacus* и CDT1 гриба *Neurospora crassa*. Наличие в составе гена *tabgl1* последовательности flag-эпитопа позволяет следить за экспрессией гена с помощью иммуноблотинга со специфическими

антителами к flag-эпитопу. Кроме этого, наличие на С-конце продукта гена *cdt1* и последовательности eGFP делает возможным определение мембранной локализации CDT1 белка с помощью микроскопического выявления флуоресценции на основе GFP-фильтра.

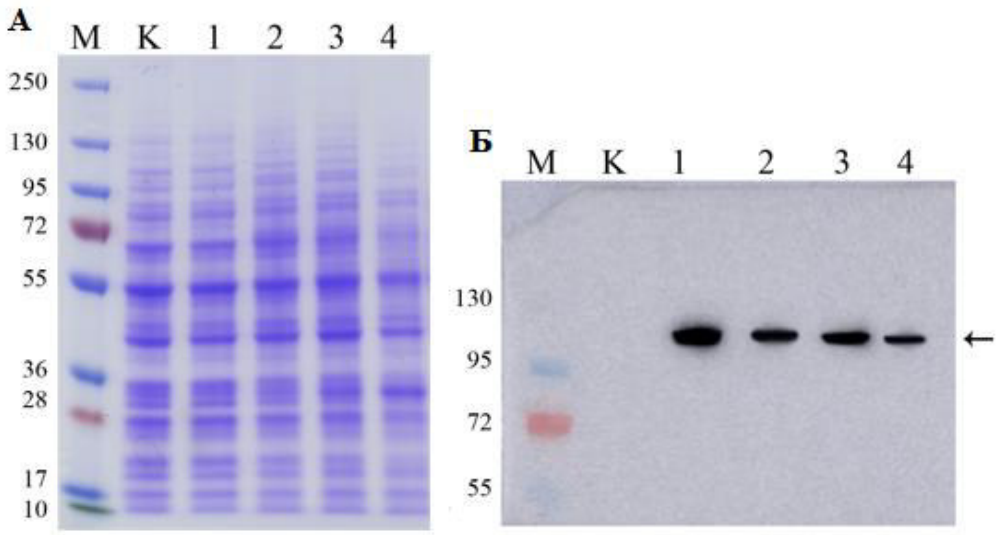
3.3.4 Анализ экспрессии β-глюкозидазы гриба *Thermoascus aurantiacus* и CDT1 гриба *Neurospora crassa* в производственном штамме *S. cerevisiae* в *HO* локусе хромосомы

Несмотря на то, что в предыдуших экспериментах было подтверждено эффективная интеграция конструированной нами экспрессионной рекомбинантной кассеты p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1*-*egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO* в геном клеток *S. cerevisiae* штамма Y-2034, было необходимо продемонстрировать, экспрессирует ли на самом деле рекомбинантный производственный штамм гетерологичные последовательности гена β-глюкозидазы гриба *Thermoascus aurantiacus* и CDT1 гриба *Neurospora crassa* в виде белков.

Для этого промышленные рекомбинантные клетки Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* культивировали в течение ночи в 20 мл среды YPD, содержащей G418. Затем ночную культуру инокулировали в 100 мл свежей среды с генетицином (100 мкг/мл) и культивировали при 30°C в течение 4 суток. Каждые 24 часа снимали по 25 мл культуры клеток и осаждали центрифугированием в течение 7 мин при 3000 x *g*, 20°C. Супернатант, содержащий сектерируемые белки, центрифугировали повторно. Клетки ресуспендировали в 1 мл лизируюшего буфера для экстракции белков (смотреть «Материалы и методы исследования»). Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Экспрессию рекомбинантных белков тестировали методом электрофореза в присутствии SDS. Для электрофоретического анализа использовали растворимые белки (супернатант). Электрофоретическое разделение белков проводили на ПААГ с 12% акриламидом. Результаты SDS-ПААГ электрофореза показаны на рисунке 47А.

Данные SDS-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой приблизительно 110 кДа в растворимой фракции. Однако с такой же молекулярной массой белковая полоса обнаруживалась в *S. cerevisiae,* несущий пустой вектор p*HO*-poly-KanMX-*HO*. Это указывало на то, что дрожжевые клетки содержат конститутивные белки с молекулярной массой аналогичной β-гликозидазе гриба *T. aurantiacus*. В последующих экспериментах для доказательства экспрессии рекомбинантного TaBGL1 гриба *T. aurantiacus,* мы использовали иммуноблоттинг с поликлональными антителами анти-flag (рисунок 47Б). Для этого белки из SDS-ПААГ перенесли на PVDF мембрану и инкубировали с анти-flag антителами. Иммуноблотинг выявил мажорные белковые полосы с молекулярной массой около 110 kDa, что соответсвовали массе исследуемого белка.

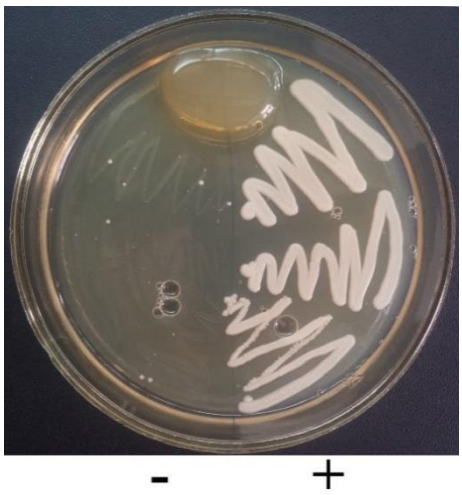


(А) SDS-ПААГ и (Б) Вестерн блоттинг белков *S. cerevisiae*, трансформированных с p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1-egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO* вектором. М - маркер молекулярной массы белка (кДА); 1-4 - клеточные экстракты *S. cerevisiae* после 24, 48, 72 и 96ч инкубации соответственно; К - клеточный экстракт *S. cerevisiae*, трансформированный с p*HO*-poly-KanMX-*HO* вектором.

Рисунок 47 – Экспрессия кДНК гена BGL1 гриба *Thermoascus aurantiacus* в *Saccharomyces cerevisiae*

Так как целлобиоза не катаболизируется дрожжами *S.cerevisiae* и не накапливается в цитоплазме, мы также сможем судить о экспрессии генов мембранного транспортера целлодекстрина гриба *N.crassa* и 1,4-β-гликозидазы гриба *T.aurantiacus* в Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* клетках по их способности расти в среде с целлобиозой, в качестве единственного источника углеводородов.

Для этого рекомбинантные клетки Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* были посеяны методом штриха в агаризованной YPD среде с 2% целлобиозой в качестве единственного источника углеводородов. Результаты анализа приведены на рисунке 48. Как видно из рисунка 48, клетки *S. cerevisiae,* несущие в геноме гены мембранного переносчика целлодекстринов гриба *N. crassa* и 1,4-β-гликозидазы гриба *T. aurantiacus,* синтезируют белок, который обеспечивает транспорт целлобиозы, целлотриозы и целлотетрозы в цитоплазму, и белок, проявляющий активность против целлобиозы, о которой можно судить по способности трансформантов расти в среде с целлобиозой. Контрольные клетки, трансформированные пустым p*HO*-poly-KanMX-*HO* вектором, не имели таковой способности, что указывало на то, что они не синтезируют белок мембранного транспорта целлобиозы и соответственно белок, обладающий β-гликозидазной активностью.



(-) *S. cerevisiae*, трансформированный с p*HO*-poly-KanMX-*HO* вектором; (+) *S. cerevisiae*, трансформированный с p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1-egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO*.

Рисунок 48 – Анализ Y-2034/*bgl1•cdt1-egfp* клеток на способность к росту в среде с целлобиозой

Параллельно мы проводили анализ экспрессии гибридного рекомбинантного белка CDT1 гриба *Neurospora* crassa слитого с eGFP на С-конце с помощью микроскопического выявления флуоресценции клеток с применением GFP-фильтра на микроскопе Zeiss Axio Observer Z1.

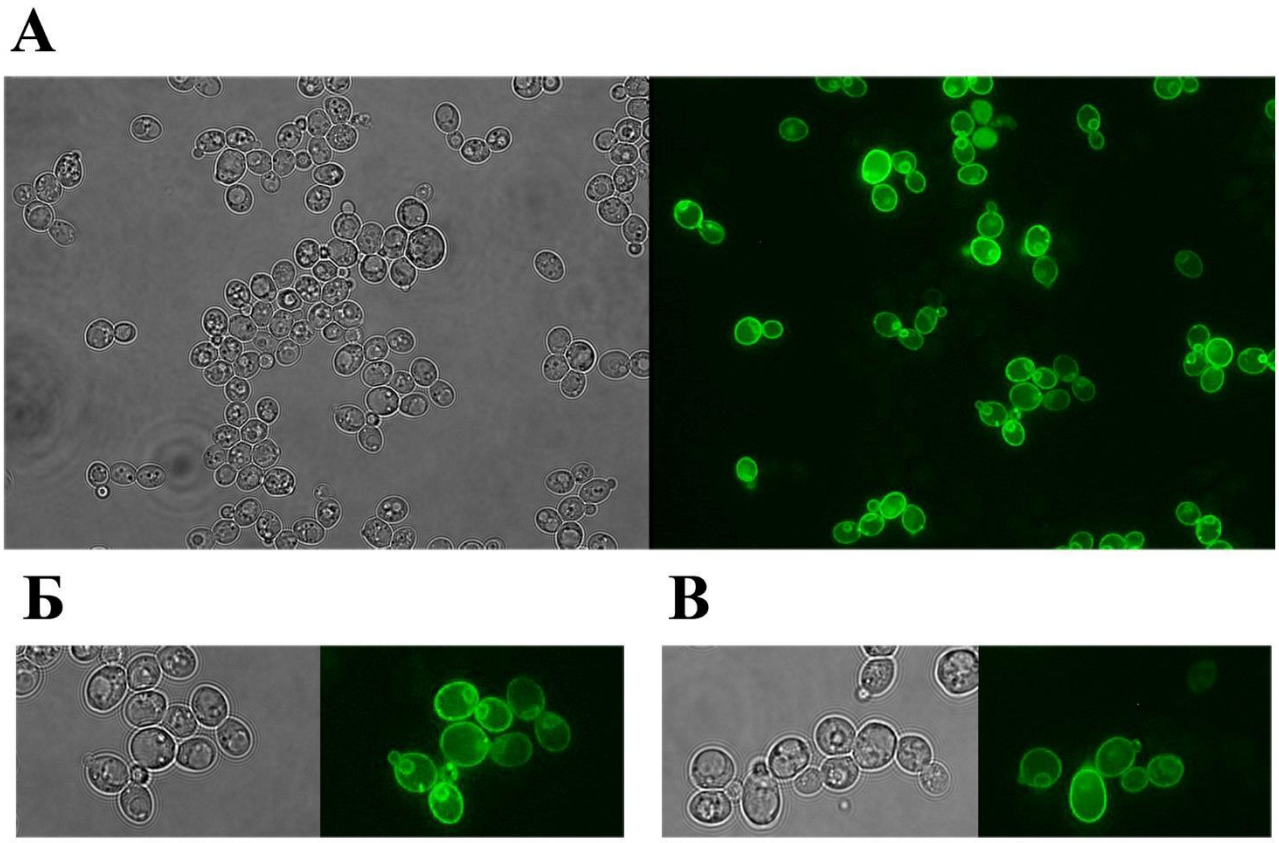
Как видно из рисунка 49, клетки, трансформированные конструкцией p*HO*-pTEF1-*tabgl1*-tADH1-pPGK1-*cdt1-egfp*-tCYC1-KanMX4-*HO*, обладали высокой нормированной флуоресценцией в зеленом канале, тогда как в клетках, трансформированных с p*HO*-poly-KanMX-*HO* вектором, не было выявлено свечения зеленого флуоресцентного белка.

3.3.5 Анализ трансформированного промышленного штамма дрожжей Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* на способность расти и производить этанол в жидкой среде с целлобиозой

В последующих экспериментах мы исследовали скорость роста нами созданных рекомбинантных дрожжей. Для этого родительский контрольный штамм и рекомбинантные дрожжи выращивали в YP среде, содержащей глюкозу (2%) или целлобиозу (2%) в качестве единственного источника углеводов, при 30°C с перемешиванием на шейкере со скоростью 200 об./мин.

В результате трёх дневного культивирования в среде с глюкозой (20 г/л), рекомбинантный штамм не продемонстрировал существенных отличий от родительского контрольного штамма (в среде с глюкозой) по скорости роста и выходу биомассы (рисунок 50А). Во-первых, это указывает на отсутствие негативного влияния синтеза рекомбинантных белков в дрожжах Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp*. Во-вторых, нами созданные рекомбинантные штаммы стали способны использовать целлобиозу в качестве единственного источника

энергии, за счет эффективной работы, интегрированных в хромосому дрожжей генов мембранного переносчика целлодекстринов гриба *N. crassa* и 1,4-β-гликозидазы гриба *T. aurantiacus*.



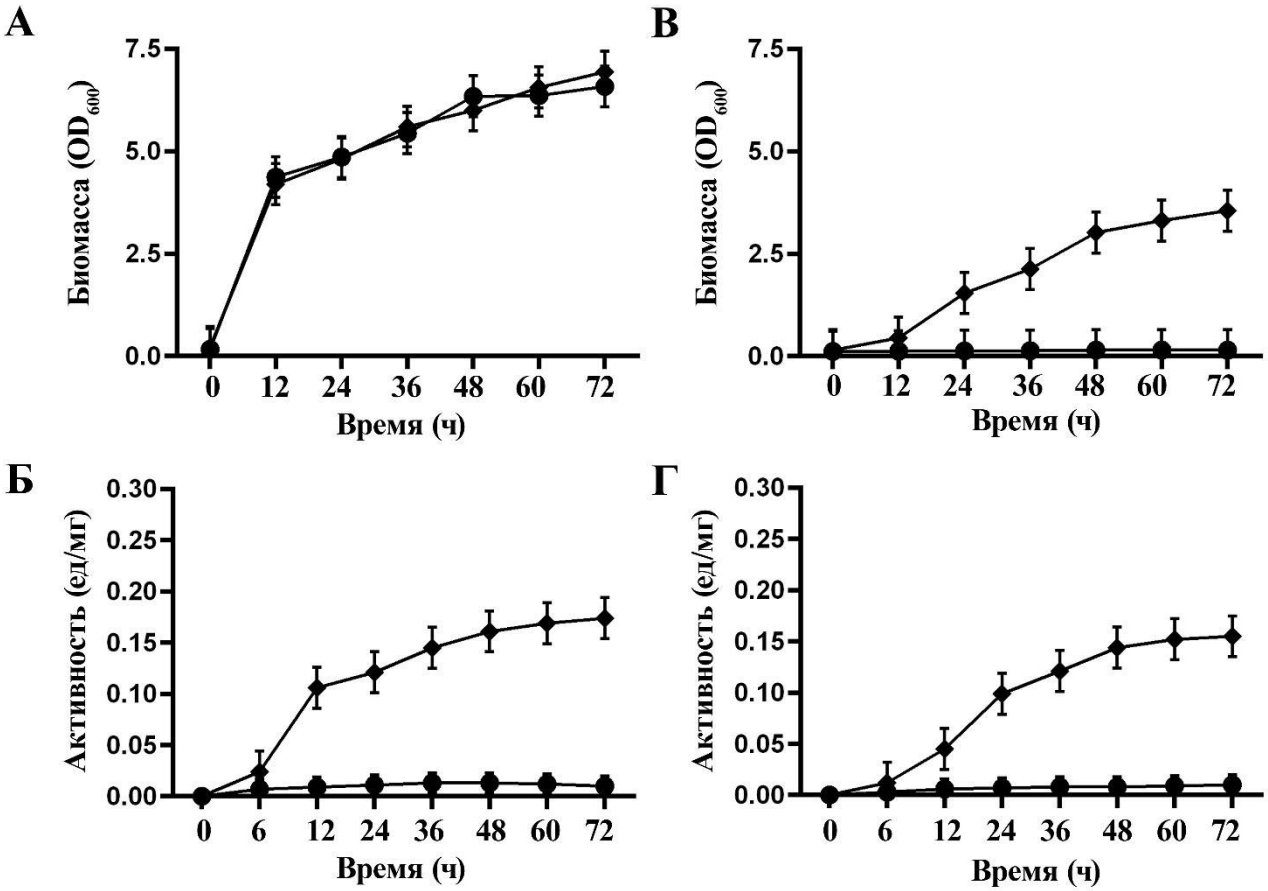
А) 100 кратное увеличение микроскопа; Б, В) 2 кратное увеличение части изображения А. На сером фоне - клетки без фильтра, на черном фоне - клетки под фильтром в зеленом канале.

Рисунок 49 – Анализ экспрессии CDT1-eGFP в культуре клеток

Способность использовать целлобиозу рекомбинантным штаммом Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp*, как единственного источника углерода, подтверждали культивированием данного штамма в YP среде с 20 г/л целлобиозы. В результате рекомбинантный штамм был способен расти аэробно в среде с целлобиозой, что указывало на то, что интегрированный внутриклеточный ген *tabgl1* функционально экспрессируется внутри клетки (рисунок 50В). Контрольный родительский штамм (Y-2034-WT), как было описано ранее, не рос в среде с целлобиозой. Рекомбинантный дрожжевой штамм в среде с 2% целлобиозой достиг меньшего OD_{600} равный 3,47 по сравнению с тем же штаммом дрожжей, культивируемых в 2% глюкозе, чей OD_{600} равен 6,94. При выращивании на среде с 20 г/л глюкозы данный штамм достиг стационарной фазы через 12 ч, тогда как при 20 г/л целлобиозы Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* проявил более медленный рост в течение первых 24ч и достиг стационарной фазы к 48 часам. Следует отметить, что OD клеток, выращенных в среде с целлобиозой, был примерно в 2 раза ниже,

чем OD клеток в среде с глюкозой после 48 часов культивирования.

Далее, мы проанализировали ферментативную активность TaBGL1 в клеточном экстракте дрожжей в разные моменты времени от 0 до 24, 48 и 72 ч, используя для культивирования 2% глюкозу или 2% целлобиозу в качестве единственных источников углерода (рисунок 50Б и 50Г). Как видно из рисунка 50, активность TaBGL1 из клеток, выращенных на среде с целлобиозой, была почти равна активности TaBGL1 из клеток, выращенных на среде с глюкозой по окончанию культивирования через 3 дня. Как и ожидалось, никакой активности не было в родительском дрожжевом штамме, несущий пустой вектор.



Динамика роста дрожжевых штаммов на глюкозе (А) и целлобиозе (В); Внутриклеточная активность β-глюкозидазы на глюкозе (Б) и целлобиозе (Г). Символы: (●) Y-2034-WT, (◆) Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp*. Показаны среднии значения трех повторных экспериментов и их ошибки - стандартные отклонения от среднего.

Рисунок 50 – Динамика роста рекомбинантного дрожжевого штамма Y-2034/*bgl1•cdt1-egfp*, экспрессирующий ген *tabgl1,* и внутриклеточная активность β-глюкозидазы

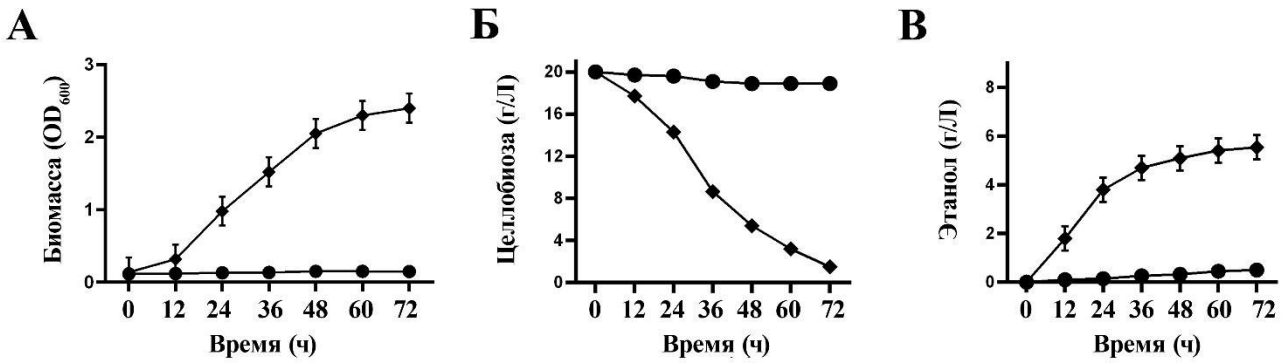
В наших экспериментах TaBGL1 был успешно экспрессирован внутриклеточно в штамме дрожжей Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* и максимальная

активность фермента достигала 0,174 ед./мг белка в клеточном экстракте за 72 часа для культуры клеток с глюкозой, что незначительно выше, чем сообщалось ранее [223, P. 542; 224, P. 110] и меньше чем в работах *Eriksen* (2013) [248, P. 66]. Расхождение между нашими результатами и полученными результатами других работ, можно объяснить тем, что имеются различия в специфическом генетическом фоне штаммов дрожжей, и использованием разных промоторов и генов *tabgl1*. Что касается активности белка для культуры клеток выращенных на целлобиозе, она составляет 0,155 ед./мг белка в клеточном экстракте за 72 часа.

Основываясь на графиках роста рекомбинантного штамма и активности TaBGL1 (рисунок 50) можно сделать вывод, что активность фермента зависит от времени культивирования дрожжевых клеток, т.е. в фазе активного роста идет максимальная экспрессия β-глюкозидазы, на что указывает резкий подъем активности данного фермента в клетках, выращенных на глюкозе. В культуре клеток, выращенных на целлобиозе, идет равномерный подъем активности фермента и ближе к 48 часам идет замедление. С переходом на фазу плато рост клеток замедляется и соответственно активность фермента держится почти на одном уровне. Помимо этого, можно сказать, что активность TaBGL1 из клеток, выращенных на среде с целлобиозой лучше, так как она почти равна активности TaBGL1 из клеток, выращенных на среде с глюкозой, в то время как OD_{600} клеток в два раза ниже. Эти данные снова подтверждают то, что активность ферментов зависит от посттрансляционных событий, включающие гликозилирование и стабильность белка, в сочетании с различными условиями роста (глюкоза и целлобиоза).

Таким образом, в нашем исследовании ген *tabgl1* был успешно внутриклеточно экспрессирован в промышленном штамме дрожжей Y-2034. Но по сравнению с секреторной формой *tabgl1,* штамм с внутриклеточной формой имел низкую скорость роста и активность. Скорее всего это обусловлено тем, что был использован другой конститутивный промотор TEF1.

На следующем этапе мы решили проверить будет ли созданный нами штамм дрожжей ферментировать целлобиозу в этанол. Для этого мы проводили ферментацию целлобиозы с помощью родительского и рекомбинантного штаммов в анаэробных условиях. Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* рекомбинантный штамм мог расти и продуцировать этанол из целлобиозы в качестве единственного источника углерода (рисунок 51В). Продуцирование этанола определяли путем посева рекомбинантного штамма дрожжей с конечной оптической плотностью при 600 нм (OD_{600}) равной 0,2 единицами в 100 мл колбу с 50 мл среды, которая содержала 2% целлобиозы. Культуру инкубировали при 30°С на качалке со скоростью 100 об./мин и продукцию этанола определяли каждые 12 часов. Полученные данные (рисунок 51В) указывают на то, что способность продуцировать этанол в обогащенной среде с целлобиозой, достигал максимума после 48 часов культивирования и далнейшее увеличение времени инкубации не меняло концентрацию этанола.



(А) OD_{600}, оптическая плотность при 600 нм. (Б) Потребление целлобиозы. (В) Концентрация этанола в зависимости от времени. Символы: (●) Y-2034-WT, (◆) Y-2034 Sc/*tabgl1•cdt1-egfp*. Показаны среднии значения трех повторных экспериментов и их ошибки - стандартные отклонения от среднего.

Рисунок 51 – Различные параметры рекомбинантного штамма *S. cerevisiae* в период анаэробного культивирования в среде с 20 г/л целлобиозой

Дрожжевой штамм Y-2034/*tabgl1•cdt1-egfp* показал более медленный рост по сравнению с Y-2034-TaBgl1, о чем свидетельствует максимальная удельная скорости роста на целлобиозе (0,040). В конечном итоге OD_{600} достиг 2,4 после 72 часов инкубации (рисунок 51А). Этот штамм употребил 71,5% (14,3 г/л) целлобиозы в течение первых 24 часов. При дальнейшей инкубации оставшаяся целлобиоза медленно снизилась до 8,5% (1,5 г/л) и не употреблялась (рисунок 51Б). В результате наших экспериментов, рекомбинантный штамм дрожжей, выращенный в среде с целлобиозой, через 72 ч продуцировал 5,55 г/л этанола (рисунок 51В). Это в 1,41 раза меньше, чем было произведенно штаммом Y-2034-TaBgl1 ранее. Выход этанола достиг 51,58% от теоретического выхода (таблица 9). Меньший выход этанола в 1,41 раз относительно штамма Y-2034-TaBgl1, скорее всего обусловлено тем, что присутствует дисбаланс между CDT1 и TaBGL1, что снижает потребление целлобиозы.

Таблица 9 – Особенности роста и выход этанола на целлобиозе для рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae*, экспрессирующих TaBGL1

Штаммы	μmax ($ч^{-1}$)	Потребление целлобиозы г ($ч^{-1}$)	Выход этанола ($г_{этанола}/г_{целлобиозы}$)	Выход этанола (%)	Выход этанола г/л
Y-2034-WT	0.0014 ± 0.0003	0,015 ± 0,002	0.025 ± 0,001	4,64	0.50 ± 0.025
Y-2034/*tabgl1 •cdt1-egfp*	0.0405 ± 0.007	0,257 ± 0,009	0.277 ± 0,011	51.58	5.55 ± 0,23

Таким образом, в результате проведенных нами работ был получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* способный конвертировать целлобиозу в

этанол за счет интегрированных в хромосому генов *cdt1* и *tabgl1*. Новый штамм *S. cerevisiae* с помощью мембранного транспортера CDT1 способен накапливать целлобиозу в цитоплазме, следовательно, конвертация целлобиозы в глюкозу происходит внутри клетки под действием внутриклеточной 1,4-β-гликозидазы.

3.4 Производство этанола промышленным штаммом *Saccharomyces cerevisiae*, коэкспрессирующий гены целлюлаз

В предыдущих разделах было установлено, что промышленный штамм Y-2034 имеет высокий секреторный фенотип (секреция TaBGL1) по сравнению с другими промышленными штаммами дрожжей. Этот штамм также продемонстрировал другие промышленно значимые характеристики, такие как интенсивность роста, множественная устойчивость к высоким температурам (37 и 40°C), высокая устойчивость к этанолу (16% этанола) и высокая устойчивость к воздействию различных концентрации ингибирующих соединений, обычно встречающиеся в гидролизатах лигноцеллюлозы. Кроме этого, нами сконструированный рекомбинантный Y-2034-TaBgl1 штамм продуцировали этанол из целлобиозы с выходом 77,6% от теоретического максимума. Однако, для полного гидролиза целлюлозы с образованием растворимых сахаров, данный штамм должен экспрессировать три основных типа целлюлаз: эндоглюканазы, экзоглюканазы и β-глюкозидазы.

В связи с этим, мы решили на основе Y-2034-TaBgl1 штамма конструировать рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* коэкспрессирующий гены эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger*, 1,4-β-гликозидазы гриба *T. Aurantiacus,* экзо-1,4-β-глюканаз гриба *L. edodes*. Для стабильного повышения числа копий генов эндо-1,4-β-глюканазы и экзо-1,4-β-глюканаз, мы решили интегрировать их в δ-последовательности генома дрожжей. Для повышения эффективности гидролиза целлюлозы, мы использовали два гена экзо-1,4-β-глюканаз гриба *L. edodes* - CEl6B, который отщепляет целлобиозу с невосстанавливающего конца цепи полимера и CEL7A, отщепляющий целлобиозу с восстанавливающего конца целлюлозы.

Известно, что длинные концевые повторы Ty 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. Векторы для δ-интеграции были успешно использованы для экспрессии человеческого фактора роста, антикоагулянта-гирудина и глюкоамилазы. Использование данной стратегии по созданию рекомбинантных штаммов дрожжей позволит внести вклад в синтез различных биохимических продуктов, используемых в нашей повседневной жизни и промышленных потребностях. Например, в хлебную промышленность. В настоящее время пекари в основном используют различные мучные добавки, такие как ферменты (амилазы, гемицеллюлазы и протеазы), чтобы изменить и улучшить свойства теста и/или качество хлеба. К тому же, из-за производства вторичных метаболитов через различные метаболические пути дрожжи влияют на вкус (производя предшественники, такие как сложные эфиры,

альдегиды и кетоны), цвет (углеводы, аминокислоты) и срок годности (кислоты, глицерин) выпеченных продуктов [249]. Все эти продукты метаболизма демонстрируют важную роль дрожжей в производстве хлеба. Таким образом, изменяя пути метаболизма или включая гены соответствующих ферментов, можно снизить цену производства и улучшить качество хлеба. Данная стратегия, может улучшить промышленные штаммы, используемые в процессах пиво- и квасоварения. Например, был создан штамм пивных дрожжей, способный к биосинтезу монотерпенов, которые дают хмелевой аромат в готовом пиве, без добавления хмеля [250]. Это позволит удешевить производство, так как использование цветков хмеля очень дорого. Другим примером является создание штаммов дрожжей, производящих терпеноиды. Терпеноиды представляют собой большой и разнообразный класс природных соединений (более 55 000 структур) со значительным коммерческим применением. Благодаря недавним сообщениям о разработке метаболизма дрожжей для производства нескольких терпеноидов с высоким выходом, стало возможным наладить коммерческое производство терпеноидов в дрожжах, которые находят применение в качестве парфюмерных ингредиентов и фармацевтических препаратов [251]. Сегодня дрожжи также используются в качестве альтернативных источников белков, энзимов и витаминов с высокой пищевой ценностью и имеют многочисленные применения в индустрии здорового питания в качестве пищевых добавок, кондиционеров и ароматизаторов, для производства микробиологических сред и экстрактов, а также для животноводства. Единственный вид, полностью приемлемый в качестве пищи для человека являются *S. cerevisiae*. Таким образом, улучшая свойства дрожжей, придавая им способность расти на неприродных субстратах, увеличивая скорость роста и биомассу дрожжей, позволит сделать получаемые дрожжевые компоненты более доступными [252]. Еще одним преимуществом данной стратегии является возможность улучшить производство D-ксилита рекомбинантными штаммами дрожжей путем включения новых метаболических путей утилизации D-ксилозы. D-Ксилит обладает почти такой же сладостью, как сахароза, но имеет более низкую энергетическую ценность, чем сахароза, поэтому его используют в качестве заменителя сахара в диетических продуктах, особенно для пациентов с дефицитом инсулина. К тому же, D-ксилоза является одним из компонентов лигноцеллюлозы [253].

Для конструирования промышленного штамма дрожжей, коэкспрессирующего гены целлюлаз, было поставлено решение следующих задач:

1) Создать интегральный экспрессионный дрожжевой вектор на основе δ-последовательности, содержащий гены эндо-1,4-β-глюканазы гриба *Aspergillus niger,* экзо-1,4-β-глюканаз гриба *Lentinula edodes* CEL6B и CEL7A.

2) Трансформировать данную конструкцию в готовый рекомбинантный промышленный штамм Y-2034-TaBgl1, содержащий ген *tabgl1* с сигнальным пептидом α-фактора дрожжей.

3) Провести анализ экспрессии и ферментативной активности ENG1, CEL6B, CEL7A в трансформированных штаммах дрожжей.

4) Исследовать способность конструированного промышленного штамма (Y-2034-TaBgl1/*eng1*•*cel6b*•*cel7a*) дрожжей сбраживать целлюлозу в этанол в анаэробных условиях с использованием в качестве источника целлюлозы авицел и предобработанную солому пшеницы.

3.4.1 Конструирование интегрального плазмидного вектора δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH-δ

Дрожжевой интегральный экспрессинонный вектор должен обладать последовательностями по которым будут происходить гомологичные рекомбинации между вектором и ДНК дрожжевой клетки. В нашем случае мы использовали δ-последовательности *Ty*-ретротранспозона. 5’ и 3’ фрагменты δ-последовательности генома дрожжей разделенные друг от друга множественным сайтом клонирования (MCS) синтезировали в фирме GeneCust (GeneCust Europe, Dudelange – Luxembourg) [254]. Затем, в pBluescript II SK/δ-MCS-δ плазмиду клонировали селективный маркерный ген *bleo* (ген устойчивочти к флеомицину) под контролем TEF промотора. Ген *bleo* амплифицировали вместе с последовательностями TEF промотора и терминатора (pTEF-*ble*-tTEF) с плазмиды pCEV-G1-Ph (рисунок 52А-Д). Далее был получен рекомбинантный вектор δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-δ (рисунок 52Ж) путем клонирования продукта рестрикции плазмиды YEGAp-*eng1* (рисунок 52Е) в вектор δ-pTEF-*ble*-tTEF-δ по тупым концам, используя тупированные *Hind*III и *Xba*I сайты. Затем для клонирования остальных двух генов экзо-1,4-β-глюканаз гриба *Lentinula edodes* CEL7A и CEL6B, мы использовали вектора YEGAp/pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH и YEGAp/pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH. Данные вектора были сконструированы с использованием YEGAp/*eng1* и амплифицированных фрагментов *cel6B* и *cel7A* с векторов pET11d/*cel6b* и pET11d/*cel7a*].

Далее фрагмент pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH (рисунок 52К), порезанный и тупированный по сайтам рестрикции *Hind*III, клонировали в δ-TEF-*ble*-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-δ вектор по тупированному сайту рестрикции *Bam*HI.

Затем, в полученный вектор δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH-δ (рисунок 52М) мы клонировали фрагмент pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH по сайту рестрикции *Hind*III (рисунок 52Н). Все рекомбинантные конструкции были проверены на наличие вставки генов *Sh ble* (рисунок 52Г), *eng1* (рисунок 52И), *cel6B* (рисунок 52Л) и *cel7A* (рисунок 52П) с помощью ПЦР с применением геноспецифичных праймеров (таблица 3).

В результате проведенных работ нами сконструирован интегративный плазмидный вектор δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH-δ (рисунок 52Р) с кДНК генами эндоглюканазы, целлобиогидролаз и геном устойчивости к флеомицину под контролем сильных конститутивных промоторов [255-257].

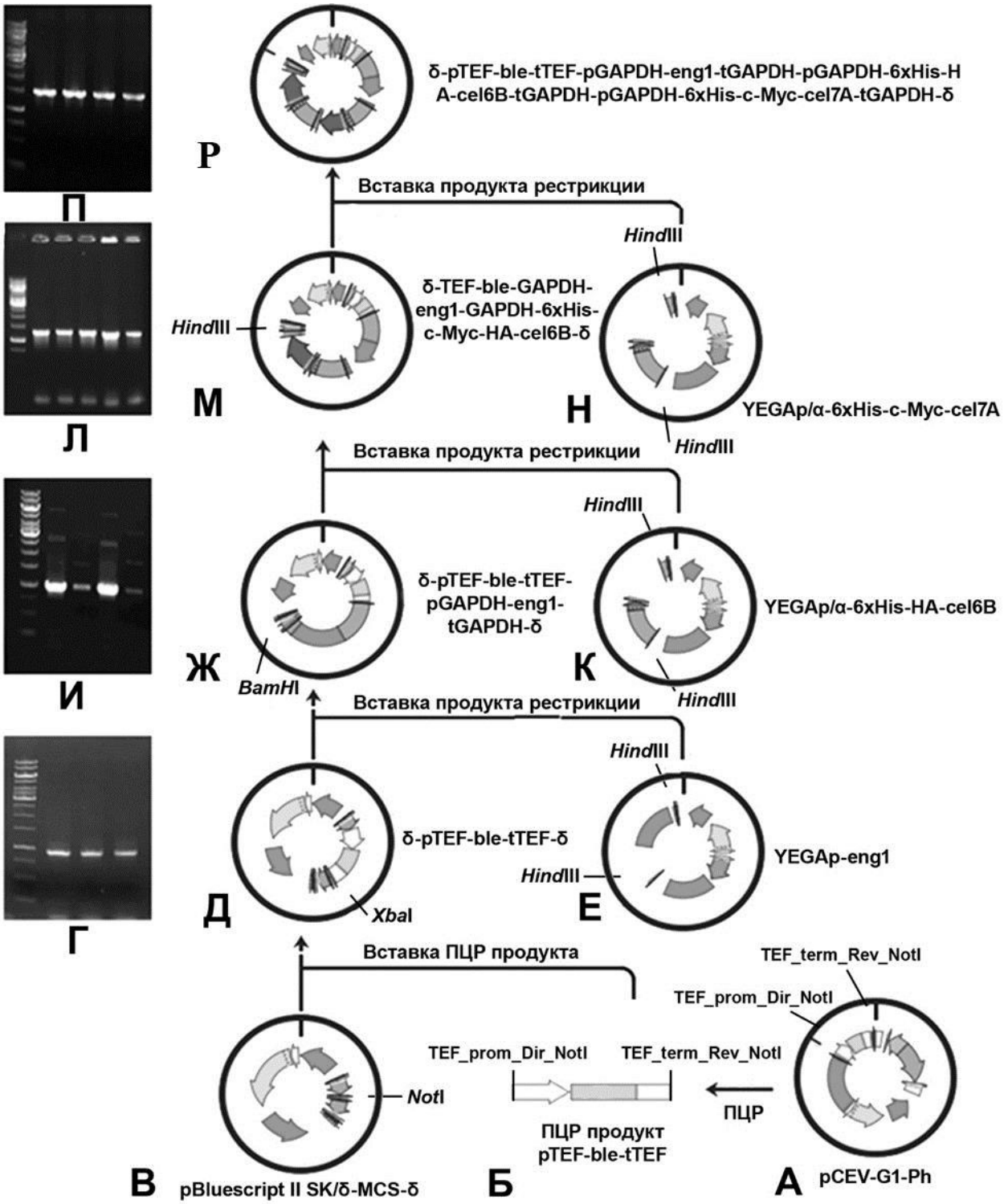
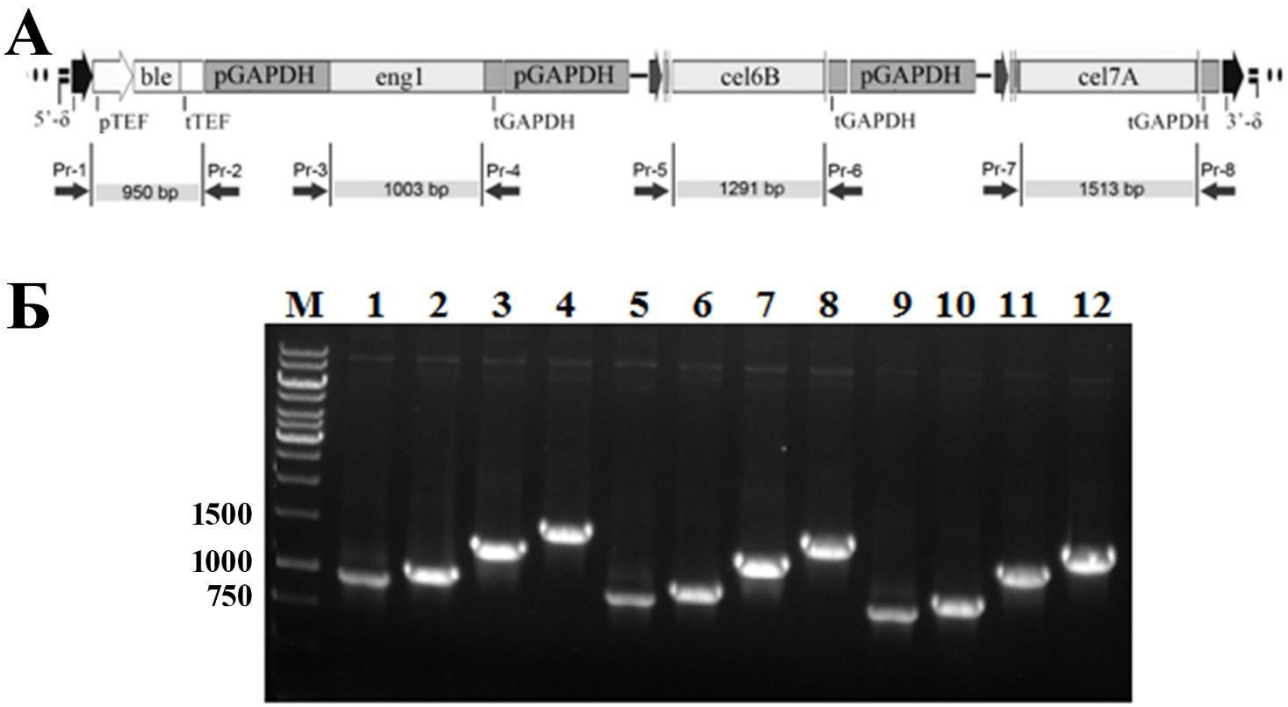


Рисунок 52 - Схема конструирования интегрального плазмидного вектора δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH-δ

3.4.2 Создание промышленных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* с генами *tabgl1* гриба *Thermoascus aurantiacus, eng1* гриба *Aspergillius niger, cel6B* и *cel7A* гриба *Lentinula edodes*

Для создания промышленного штамма *S.cerevisiae*, коэкспрессирующий белки TaBGLI, ENG1, CEL6B и CEL7A, полученный нами δ-pTEF-*ble*-tTEF-

pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH-δ экспрессионный вектор линеаризировали обработкой ферментом рестрикции *Asc*I, и трансформировали LiAc/PEG/ssDNA методом [258] в ранее полученные нами дрожжевые клетки Y-2034-TaBgl1. Скрининг трансформированных клеток проводили на селективной агаризованной среде YPD агар, содержащий флеомицин в концентрации 10 мкг/мл и G418 в концентрации 100 мкг/мл. Хромосомная интеграция экспрессионной кассеты с вышеназванными генами была проверена методом ПЦР с применением геноспецифичных пар праймеров (таблица 4) и с использованием геномной ДНК в качестве матрицы. В результате длины ПЦР продуктов на агарозном гель-электрофореграмме, полностью соответствовали длине клонированных генов: ген *ble* с сильными конститутивными TEF промотором и терминатором - 957 п.н., ген *eng1* - 1003 п.н., ген *cel6B* - 1297 п.н. и ген *cel7A* - 1519 п.н. (рисунок 53).

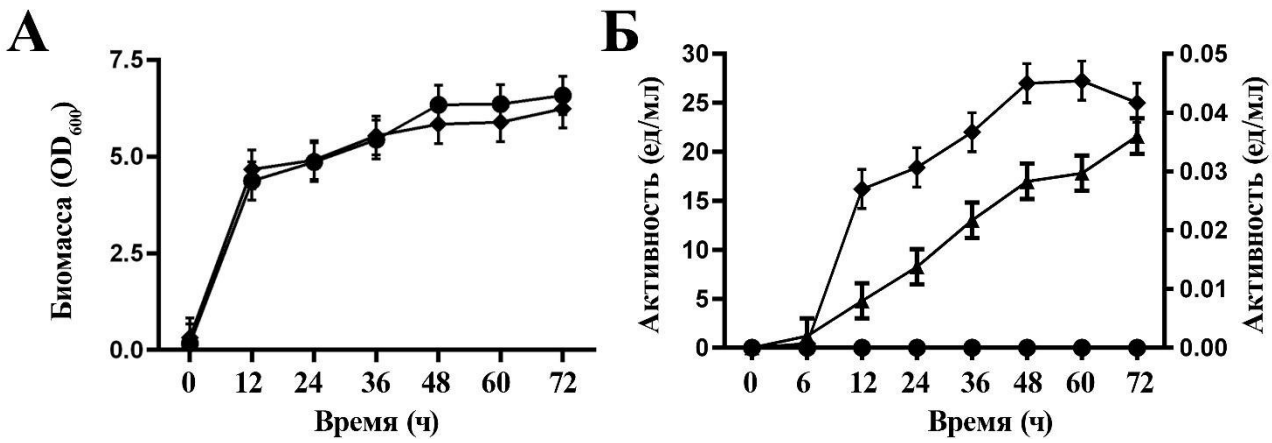


А) линейная форма кассеты δ-pTEF-*ble*-tTEF-pGAPDH-*eng1*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel6B*-tGAPDH-pGAPDH-α-*cel7A*-tGAPDH-δ с картой праймеров; Б) Продукты ПЦР полученные с применением Pr-1-Pr-8. М – маркер молекулярного размера 1 тпн.; 1,5,9 - ПЦР продукты гена *ble*; 2,6,10 - ПЦР продукты гена *eng1*; 3,7,11 - ПЦР продукты гена *cel6B*; 4,8,12 - ПЦР продукты гена cel7A.

Рисунок 53 – Анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции

3.4.3 Анализ экспрессии ENG1, CEL6B, CEL7A в промышленном Y-2034-TaBgl1/*eng1•cel6b•cel7a* штамме *Saccharomyces cerevisiae* методом определения ферментационной активности

Для проверки эффективности роста рекомбинантных штаммов, экспрессирующих гены целлюлаз, мы культивировали дрожжи в течение 72 часов в YPD среде при аэробных условиях. При этом родительские штаммы служили в качестве контроля. Необходимо отметить, что рекомбинантные штаммы дрожжей росли в среде с 20 г/л глюкозы также эффективно, как и исходные родительские штаммы, что указывает на то, что конститутивная экспрессия интегрированных генов целлюлаз не оказывает вредного воздействия на способность роста дрожжевых клеток (рисунок 54А). Далее, мы анализировали активность секретированной эндо-1,4-β-глюканазы в культуральной среде в разные промежутки времени от 0 до 12, 24, 48 и 72 ч, используя 2% глюкозу в качестве единственного источника углерода (рисунок 54Б).



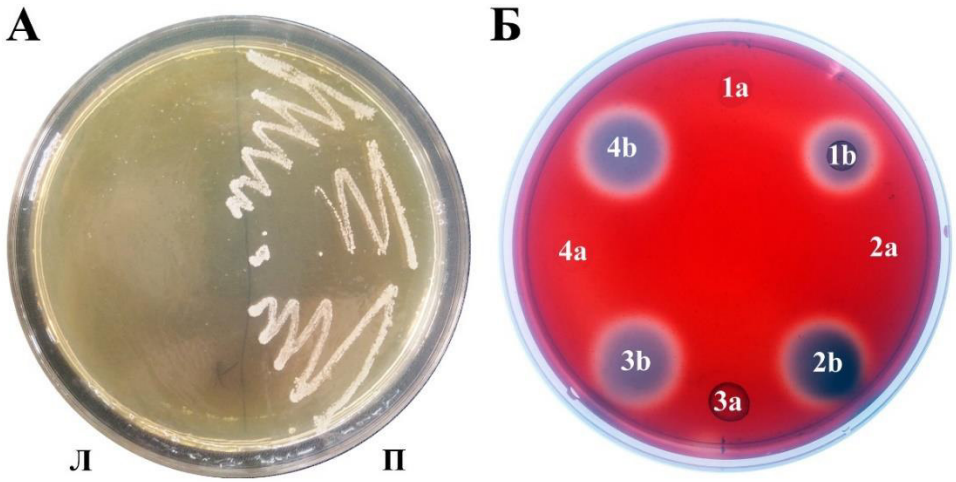
А) Динамика роста. Б) Ферментативная активность. Символы: (●) Y-2034-WT; (♦) Y-2034-TaBgl1*/eng1• cel6b•cel7a* (ENG1), (▲) Y-2034-TaBgl1*/eng1• cel6b•cel7a* (CEL6B и CEL7A). Показаны средние значения трех повторных экспериментов и их ошибки - стандартные отклонения от среднего.

Рисунок 54 - Динамика роста рекомбинантного дрожжевого штамма Y-2034-TaBgl1/*eng1• cel6b•cel7a,* внеклеточная активность 1,4-β-эндоглюканазы и целлобиогидролаз

В результате проведенных экспериментов, мы наблюдали, что активность ENG1 в течение первых 6 часов отсутствовала. Затем, секретируемая ферментативная активность рекомбинантного штамма стала расти и достигла 27,25 ед./мл активности после 48 ч роста. После 60 ч культивирования активность ENG1 фермента стала постепенно снижаться. Никакой ферментативной активности не было обнаружено в родительском дрожжевом штамме.

После того, как мы показали экспрессию гена *eng1*, мы приступил к анализу активности экзо-1,4-β-глюканаз гриба *Lentinula*. Для этого мы провели анализ активности фермента с использованием п-нитрофенил-β-D-целлобиозида (pNPG) в качестве субстрата (рисунок 54Б).

Из выше приведённого графика видно, что в культуральной среде целлобиогидролазная активность увеличивается по мере увеличения времени инкубации. Активность фермента в культуральной среде к 72 часам достигла 0,036 ед/мл. Активность CEL6B и CEL7A белков гриба *Lentinula edodes* изучалась ранее в работе Тайпаковой С. [200, С. 77]. Но в ее работе использовалась эписомальная плазмида YEGAp с GAPDH промотором и терминатором. Способны ли нами созданные рекомбинантные дрожжи использовать целлюлозу в качестве источника энергии? Для выяснения этого вопроса, мы рекомбинантный (Y-2034-TaBgl1*/eng1•cel6B•cel7A*) и родительский дрожжжевые клетки посеяли на агаризованую среду YP, содержащую 2% КМЦ в качестве единственного источника углерода, и инкубировали при 30°С в течение 72 часов. Как видно из рисунка 55А, родительский штамм не был способен расти на среде с КМЦ. Тогда как, рост рекомбинантного штамма *S.cerevisiae* была обильным в среде с КМЦ (рисунок 55Б), что указывает на то, что гены целлюлаз экспрессируются в достаточном количестве для того, чтобы обеспечивать рост дрожжей в среде с КМЦ. Далее, мы экспрессию эндо-1,4-β-глюканазы проверяли с помощью окрашивания чашек раствором «Конго красный» (0,5%) после инкубации в течение трех суток при 30°С на агаризованной среде с КМЦ.



А) Рост родительского и рекомбинантного штаммов в среде на КМЦ. Л – левая сторона с Y-2034-WT штаммом. П – правая сторона с Y-2034-TaBgl1*/eng1• cel6b•cel7a* штаммом; Б) Окрашивание чашки с выращенными на КМЦ рекомбинантным штаммом с «Конго Красный». 1-4 - колонии. а – родительский штамм; б – рекомбинантный штамм.

Рисунок 55 - Анализ дрожжевых клеток Y-2034-TaBgl1*/eng1•cel6b•cel7a* на способность к росту в среде с КМЦ и к экспрессии эндоглюканазы

Как видно из результатов представленных на рисунке 55Б, вокруг колонии *S. cerevisiae,* трансформированных интегративным плазмидным вектором, четко проявляются зоны просветления. Тогда как, вокруг контрольных колоний *S.*

cerevisiae зоны просветления не обнаруживались. Эти данные также указывают на то, что трансформированные клетки *S. cerevisiae* эффективно синтезируют и секретируют эндо-1,4-β-глюканазу гриба *Aspergillus niger*.

Способности Y-2034-TaBgl1*/eng1•cel6b•cel7a* рекомбинантного штамма ферментировать целлюлозосодержащий субстрат исследовали в условиях анаэробного роста с авицел в качестве единственного источника углерода. Авицел был использован в качестве эталона, потому что это чистая микрокристаллическая целлюлоза (97%) и не содержит лигнина. Чтобы определить эффективность ферментации с использованием авицел, дрожжевые клетки предварительно культивировали аэробно в среде YPD при 30°C в течение 72 часов. Затем клетки ресуспендировали до начальной концентрации клеток, соответствующей OD_{600} равной 20 в 20 мл среды YP, содержащей 5% авицел и культивировали в течение 3 дней. Образование этанола смотрели через 3 дня культивирования. При использовании авицел в качестве субстрата было получено 5,62 г/л этанола (22% от теоретического максимального выхода) за 72 часа культивирования для штамма Y-2034-TaBgl1/eng1•cel6b•cel7a, в то время как Y-2034-TaBgl1 и контрольный родительский штамм показали мизерное количество выхода этанола 0,87 г/л и 0,31 г/л соответственно (таблица 10), что указывает на возможное присутствие в низких концентрациях глюкозы или целлобиозы в препарате авицел.

Второй вариант исследований заключался в исследовании возможности прямой конверсии предобработанной щелочью соломы пшеницы в этанол. Щелочная предобработка предполагает использование щелочных растворов, например, NaOH или аммиака для извлечения лигнина, а также повышения доступности целлюлозы для целлюлитических ферментов. Щелочная предобработка может привести к резкому росту уровня осахаривания [259]. Этот способ более эффективно используется для предобработки сельскохозяйственных отходов, а не древесных материалов.

Как видно из таблицы 10, выход этанола из пшеничной соломы был относительно низким. Это связанно с тем, что солома в среднем содержит 35-50% целлюлозы, 15-30% гемицеллюлозы, 20-30% лигнина и меньшего количества золы и других соединений [60, P. 1579; 61, P. 374]. Соответственно наличие эндоглюканаз, целлюбиогидролаз и β-гликозидаз никак не влияют на гидролиз гемицеллюлаз и лигнина по сравнению с микрокристаллической целлюлозой (авицел), хотя после предварительной обработки часть лигнина высвобождалась наружу, высвобождая целлюлозу. Гемицеллюлозы и матрица лигнина, окружающая целлюлозу, препятствует эффективной деградации лигноцеллюлозы после деградации целлюлозы. Наличие небольшого количества этанола в культуре с Y-2034-TaBgl1 говорит о том, что небольшая часть целлобиозы, целлотриозы, целлотетрозы было образовано в процессе предобработки соломы, что послужило субстратом для β-гликозидазы в процессе ферментации.

Таблица 10 – Выход этанола на авицеле и предобработанной соломе для рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae*, экспрессирующих целлюлазы

Штаммы	Выход этанола (г/г)	Выход этанола (%)	Выход этанола, г/л
Авицел (5%)			
Y-2034-WT	-	0,31	0,08±0,008
Y-2034-TaBgl1	-	0,87	0,23±0,021
Y-2034-TaBgl1*/eng1•cel6b•cel7a*	0,112±0,095	22,0	5,62±0,45
Предобработанная солома (5%)			
Y-2034-WT	-	0,29	0,029±0,003
Y-2034-TaBgl1	-	0,53	0,054±0,006
Y-2034-TaBgl1*/eng1•cel6b•cel7a*	0,072±0,006	14,0	1,43±0,1

Таким образом, результаты показали, что нами сконструированный рекомбинантный штамм наиболее эффективно конвертировал авицел в этанол, концентрация этанола при этом достигала 5,62 г/л за 3 суток. По-видимому, авицел обладал большей биодоступностью по сравнению с предобработанной соломой пшеницы. При конверсии предобработанной соломой пшеницы были достигнуты концентрации спирта 1,43 г/л [260]. При пересчете исходного количества соломы пшеницы на 1000 г, концентрация образующегося спирта соответствовала значениям 28,6 г/л. При исследовании конверсии авицел, концентрация этанола при пересчете на 1000 г субстрата количество спирта составило 112,4 г/л.

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 этанол 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Tiwari S., Jadhav S.K., Sharma M., Tiwari K.L. Fermentation of waste fruits for bioethanol production // Asian Journal of Biological Sciences. - 2014. - Vol. 7. - P. 30-34.

2 Douglas G.T. Economic and environmental impacts of U.S. corn ethanol production and use // Federal Reserve Bank of St. Louis Regional Economic Development. - 2009. - Vol. 5. - P. 42-58.

3 Li L.J., Wang Y., Zhang, Q Li, J.X., Yang X.G., Jin J. Wheat straw burning and its associated impacts on Beijing air quality // Sci. China Ser D-Earth Sci. - 2008. - Vol. 51, №3. - P. 403-414.

4 Блинов И.П. Химия микробных полисахаридов. - М.: Высш. шк., 1984. - 162 с.

5 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. - Vol. 70. - P. 1207-1212.

6 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. - Vol. 76. - P. 1251-1260.

7 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. - Vol. 5. - P. 449-455.

8 Kuhad R.C., Gupta R., Singh A. Microbial cellulases and their industrial applications // Enzyme Res. - 2011. - Vol. 2011. - P. 280696.

9 Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // Biotechnol. Adv. - 2000. - Vol. 18. - P. 355-383.

10 Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2002. - Vol. 66. - P. 506-577.

11 Olsson L. and Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production // Enzyme Microbial Technol. - 1996. - Vol. 18. - P. 312-331.

12 Olsson L. and Hahn-Hagerdal B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates // Process Biochem. - 1993. - Vol. 28. - P. 249-257.

13 Van Maris A.J., Abbott D.A., Bellissimi E., van den Brink J., Kuyper M., Luttik M.A., Wisselink H.W., Scheffers W.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2006. - Vol. 90. - № 4. - P. 391-418.

14 Den Haan R., Rose S.H., Lynd L.R., Van Zyl W.H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // Metab. Eng. - 2007. - Vol. 9. - P. 87-94.

15 Tsai S.L., Goyal G., Chen W. Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production // Appl. Environ. Microbiol. - 2010. - Vol. 76. - P. 7514-7520.

16 Fan L.H., Zhang Z.J., Yu X.Y., Xue Y.X., Tan T.W. Self-surface assembly of cellulosomes with two mini scaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 2012. - Vol. - 109. - P. 13260-13265.

17 Van Rensburg R., Van Zyl W.H., Pretorius I.S. Engineering yeast for efficient cellulose degradation // Yeast. -1998. - Vol 14. - P. 67-76.

18 Liu Z., Ho S.-H., Sasaki K., den Haan R., Inokuma K., Ogino C., van Zyl W.H., Hasunuma T. and Kondo A. Engineering of a novel cellulose-adherent cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic biofuel production // Scientific Reports. - 2016. - Vol. 6. - P. 24550.

19 Yamada R., Hasunuma T., Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing // Biotechnol. Adv. - 2013. - Vol. 31. - P. 754-763.

20 Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Kondo A. Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2010. - Vol. 88. - P. 849-857.

21 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. - Vol. 3. - P. 302-306.

22 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. - Vol. 85, № 1. - P. 41-48.

23 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. - Vol. 32. - P. 713-719.

24 Albers E., Larsson C. A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 2009. - Vol. 36, - P. 1085-1091.

25 Hector R.E., Dien B.S., Cotta M.A., Qureshi N. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion // J Ind Microbiol Biotechnol. - 2011. - Vol. 38. - P. 1193-1202.

26 Pajares I.G., Elegado F.B., Magbanua J.P.V., Raymundo A.K. Selection of high ethanol-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains, their fermentation properties, and genetic differentiation based on rep-PCR and mt rDNA-PCR // Philippine Journal of Science. - 2009. - Vol. 138. - P. 37-48.

27 Deparis Q., Claes A., Foulquie-Moreno M.R., Thevelein J.M. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories // FEMS Yeast Research. - 2017. - Vol. 17, № 4. - P. fox036.

28 Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood // Enzyme Microb Tech. - 1999. - Vol. 24. - P. 151-159.

29 Larsson S., Quintana-Sainz A., Reimann A., Nilvebrant N.O., Jönsson L.J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* // Appl Biochem Biotech. - 2000. - Vol. 559. - P. 617-632.

30 Keating J.D., Robinson J., Bothast R.J., Saddler J.N., Mansfield S.D. Characterization of a uniqueethanologenic yeast capable of fermenting galactose // Enzyme Microb Technol. - 2004. - Vol. 35. - P. 242-253.

31 Wang M., Wang J., Tan J.X., Mou J.F. Optimization of ethanol fermentation from sweet sorghum juice using response surface methodology // Energy Sources. - 2011. - Vol. 33. - P. 1139-1146.

32 Phutela U.G., Kaur J. Process optimization for ethanol production from sweet sorghum juice using *Saccharomyces cerevisiae* strain NRRL Y-2034 by response surface methodology // Sugar Tech. - 2014. - Vol. 16. - P. 411-421.

33 Yu S., Jeppsson H., Hahn-Hagerdal B. Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1995. - Vol. 44. - P. 314-320.

34 Cheng C., Tang R.Q., Xiong L., Hector R.E., Bai F.W., Zhao X.Q. Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose-utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae //* Biotechnol Biofuels. - 2018. - Vol. 11. - P. 28.

35 Waldron K.W. Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass. - Elsevier: Woodhead Publishing, 2010.

36 Wang M., Saricks C., Santini D. Effects of fuel ethanol use on fuel-cycle energy and greenhouse gas emissions. - Argonne National Laboratory, 1999.

37 Hamelinck C.N., Van Hooijdonk G., Faaij A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term // Biomass and bioenergy. - 2005. - Vol. 28. - P. 384- 410.

38 Al-Baghdadi M.A.S. Hydrogen-ethanol blending as an alternative fuel of spark ignition engines // Renew. Energy. - 2003. - Vol. 28. - P. 1471-1478.

39 He B-Q., Hao J-M., Yan X-G., Xiao J-H. A study on emission characteristics of an EFI engine with ethanol blended gasoline fuels // Atmos. Environ. - 2003. - Vol. 37. - P. 949-957.

40 Weber C., Farwick A., Benisch F., Brat D., Dietz H., Subtil T., Boles E. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2010. - Vol. 87. - P. 1303-1315.

41 Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review // Renew. Sustain. Energy Rev. - 2010. – Vol. 14. – P. 578–597.

42 Fuel ethanol production worldwide in 2018, by country (in million gallons). - Режим доступа: https://www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries/ (15.02.2017).

43 Lynd L.R., Van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update // Curr. Opin. Biotechnol. - 2005. - Vol. 16. - P. 577-583.

44 Baskar C., Baskar S., Dhillon R.S. Biomass conversion: the interface of biotechnology, chemistry and materials science. - Springer Science & Business Media, 2012.

45 Fischer C.R., Klein-Marcuschamer D., Stephanopoulos G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production // Metab. Eng. - 2008. - Vol. 10. - P. 295-304.

46 Kim S., Dale B.E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues // Biomass and Bioenergy. - 2004. - Vol. 26. - P. 361-375.

47 Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2001. - Vol. 56. - P. 17-34.

48 Mabee W.E., Gregg D.J., Arato C., Berlin A., Bura R., Gilkes N., Mirochnik O., Pan X., Pye E.K., Saddler J.N. Updates on softwood-to-ethanol process development // Appl Biochem Biotechnol. - 2006. - Vol. 129-132. - P. 55-70.

49 Tomas-Pejo E., Oliva J.M., Ballesteros M., Olsson L. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains // Biotechnol. Bioeng. 2008. - Vol. 100. - P. 1122-1131.

50 Cavka A., Alriksson B., Rose S.H., van Zyl W.H., Jonsson L.J. Production of cellulosic ethanol and enzyme from waste fiber sludge using SSF, recycling of hydrolytic enzymes and yeast, and recombinant cellulase-producing *Aspergillus niger* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 2014. - Vol. 41. - P. 1191-200.

51 Sun Y. and Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review // Bioresource Technol. - 2002. - Vol. 83. - P. 1-11.

52 Galbe M., Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production // Adv Biochem Eng Biotechnol. - 2007. - Vol. 108. - P. 41-65.

53 Cullis I.F., Mansfield S.D. Optimized delignification of wood-derived lignocellulosics for improved enzymatic hydrolysis // Biotech Bioeng. - 2010. - Vol. 106. - P. 884-893.

54 Shuai L., Yang Q., Zhu J.Y., Lu F.C., Weimer P.J., Ralph J., Pan X.J. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production // Bioresour Technol. - 2010. - Vol. 101. - P. 3106-3114.

55 Arantes V., Saddler J.N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates // Biotechnol Biofuels. - 2011. - Vol. 4. - P. 3.

56 Ullah K., Kumar Sharma V., Dhingra S., Braccio G., Ahmad M., Sofia S. Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review // Renew. Sustain. Energy Rev. - 2015. - Vol. 51. - P. 682-698.

57 Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production // Ind. Eng. Chem. Res. - 2009. - Vol. 48. - P. 3713-3729.

58 Lignocellulose. - Режим доступа: https://aavos.eu/glossary/lignocellulose/ (15.02.2017)

59 Petersen A.M, Melamu R, Knoetze J.H., Görgens J.F. Comparison of second-generation processes for the conversion of sugarcane bagasse to liquid biofuels in terms of energy efficiency, pinch point analysis and life cycle analysis // Energy Convers. Manag. - 2015. - Vol. 91. - P. 292-301.

60 Hall M., Bansal P., Lee J.H., Realff M.J., Bommarius A.S. Cellulose crystallinity - A key predictor of the enzymatic hydrolysis rate // FEBS J. - 2010. - Vol. 277. - P. 1571-1582.

61 Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R., Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol // Curr. Opin. Biotechnol. - 2009. - Vol. 20. P. 372-80.

62 Almeida J.R.M., Modig T., Petersson A., Hahn-Hagerdal B., Liden G., Gorwa-Grauslund M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae //* J Chem Technol Biotechnol. - 2007. - Vol. 82. - P. 340-349.

63 Zaldivar J., Martinez A., and Ingram L.O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* // Biotechnol. Bioeng. - 1999. - Vol. 65. - P. 24-33.

64 Klinke H.B., Thomsen A.B. and Ahring B.K. Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass // Appl Microbiol Biotechnol. - 2004. - Vol. 66. - P. 10-26.

65 Palmqvist E. and Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors andmechanisms of inhibition // Bioresource Technol. - 2000. - Vol. 74. - P. 25-33.

66 Dunlop A.P. Furfural formation and behavior // Ind Eng Chem. - 1948. - Vol. 40. - P. 204-209.

67 Ulbricht R.J., Northup S.J. and Thomas J.A. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions // Fundam Appl Toxicol. - 1984. - Vol. 4. - P. 843-853.

68 Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood // Enzyme Microbial Technol. - 1999. - Vol. 24. - P. 151-159.

69 Klinke H.B., Olsson L., Thomsen A.B. and Ahring B.K. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast // Biotechnol Bioeng. - 2003. - Vol. 81. - P.738-747.

70 Modig T., Liden G. and Taherzadeh M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase // Biochem J. - 2002. - Vol. 363. - P. 769-776.

71 Banerjee N., Bhatnagar R. and Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae //* Appl Microbiol Biotechnol. - 1981. - Vol. 11. - P. 226-228.

72 Palmqvist E., Almeida J.S. and Hahn-Hagerdal B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture // Biotechnol Bioeng. - 1999. - Vol. 62. - P. 447-454.

73 Sarvari Horvath I., Franzen C.J., Taherzadeh M.J., Niklasson C., et al. Effects of furfural on the respiratorymetabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats // Appl Environ Microbiol. - 2003. - Vol. 69. - P. 4076-4086.

74 Allen S., Clark W., Mccaffery J.M., Cai Z., Lanctot A., Slininger P., et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae //* Biotechnol. Biofuels. - 2010. - Vol. 3. - P. 2.

75 Russel J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling // J Appl Bacteriol. - 1992. - Vol. 73. - P. 363-370.

76 Verduyn C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields // Antonie Van Leeuwenhoek. - 1991. - Vol. 60. - P. 325-353.

77 Verduyn C., Postma E., Scheffers W.A. and Van Dijken J.P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuousculture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation // Yeast. - 1992. - Vol. 8. - P. 501-517.

78 Pampulha M.E. and Loureiro-Dias M.C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast // Appl Microbiol Biotechnol. - 1989. - Vol. 20. - P. 286-293.

79 Palmqvist E., Grage H., Meinander N.Q. and Hahn-Hagerdal B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and phydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts // Biotechnol Bioeng. - 1999. - Vol. 63. - P. 46-55.

80 Bauer B.E., Rossington D., Mollapour M., Mamnun Y., Kuchler K. and Piper P.W. Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influenceof amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants // Eur J Biochem. - 2003. - Vol. 270. - P. 3189-3195.

81 Popoff T. and Theander O. Formation of aromatic compounds from carbohydrates - Part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution // A. Chem Scand B. - 1976. - Vol. 30. - P. 397-402.

82 Perez J., Munoz-Dorado J., de la Rubia T. and Martinez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview // Int Microbiol. - 2002. - Vol. 5. - P. 53-63.

83 Keweloh H., Weyrauch G., and Rehm H.-J. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli //* Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1990. - Vol. 33. - P. 66-71.

84 Heipieper H.J., Weber F.J., Sikkema J., Keweloh H. and De Bont J.A.M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents // Trends Biotechnol. - 1994. - Vol. 12. - P. 409-415.

85 Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation // Environ Health Perspect. - 1990. - Vol. 87. - P. 213-218.

86 Mills C., Child J.J., and Spencer J.F.T. The utilization of aromatic compounds by yeasts // Antonie Van Leeuwenhoek. - 1971. - Vol. 37. - P. 281-287.

87 Kubota S., Takeo I., Kume K., Kanai M., Shitamukai A., Mizunuma M., et al. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 2004. - Vol. 68. - P. 968-972.

88 Ibeas J.I. and Jimenez J. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts // Appl. Environ. Microbiol. - 1997. - Vol. 63. - P. 7-12.

89 Chi Z. and Arneborg N. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae //* J. Appl. Microbiol. - 1999. - Vol. 86. - P. 1047-1052.

90 Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2002. - Vol. 66. - P. 300-372.

91 Chowdhury S., Smith K.W. and Gustin M.C. Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation // J. Cell Biol. - 1992. - Vol. 118. - P. 561-571.

92 Panchal C.J. and Stewart G.G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain // J. Inst. Brew. - 1980. - Vol. 86. - P. 207-210.

93 D'Amore T., Panchal C., Russeil I., and Stewart G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation // J. Ind. Microbiol. - 1988. - Vol. 2. - P. 365-372.

94 Bertrand E., Vandenberghe L.P.S., Soccol C.R. et al. First generation bioethanol // In.: Green fuels technology. - Springer International Publishing, 2016. - 175-212.

95 Fan Z., South C., Lyford K. et al. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor // Bioprocess Biosyst Eng. - 2003. - Vol. 26. - P. 93-101.

96 Suutari M., Liukkonen K. and Laakso S. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids // J. Gen. Microbiol. - 1990. - Vol. 136. - P. 1469-1474.

97 Suutari M., Rintamäki A. and Laakso S. Membrane phospholipids in temperature adaptation of *Candida utilis*: alterations in fatty acid chain length and unsaturation // J. Lipid Res. - 1997. - Vol. 38. - P. 790-794.

98 Dickson R.C., Nagiec E.E., Skrzypek M., Tillman P., Wells G.B. and Lester R.L. Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces //* J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - P. 30196-30200.

99 Jenkins G.M., Richards A., Wahl T., Mao C., Obeid L. and Hannun Y. Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae //* J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - P. 32566-32572.

100 Choudhary J., Singh S., Nain L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass // Electronic J Biotechn. - 2016. - Vol. 21. - P. 82-92.

101 Kawaguchi H., Hasunuma T., Ogino C. et al. Bioprocessing of biobased chemicals produced from lignocellulosic feedstocks // Curr Opin Biotechnol. - 2016. - Vol. 42. - P. 30-39.

102 Schneiter R. Genetics, molecular and cell biology of yeast // Yeast Genetics, 2004. - P. 4.

103 Pringle J.R. and Hartwell L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle // In.: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance. - N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1981. - P. 97-142.

104 Mortimer R.K. and Hawthorne D.C. Yeast genetics // In.: The Yeasts. - New York: Academic Press, 1969. - Vol 7. - P. 385-460.

105 Herskowitz I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiological Reviews. - 1988. - P. 536-553.

106 Duntze W., MacKay V.L. and Manney T.R. *Saccharomyces cerevisiae*: a diffusible sex factor // Science. - 1970. - Vol. 168. - P. - P.1472-1473.

107 Wilkinson L.E. and Pringle J.R. Transient Gl arrest of *Saccharomyces cerevisiae* of mating type a by a factor produced by cells of mating type a // Exp. Cell Res. - 1974. - Vol. 89. - P. 175-187.

108 Jensen Jr.R., Sprague G.F., Herskowitz I. Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of HO gene expression by the yeast mating type locus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1983. - Vol. 80. - P. 3035-3039.

109 Strathern J, Hicks J. and Herskowitz I. Control of cell type in yeast by the mating type locus: the al-a2 hypothesis // J. Mol. Biol. - 1981. - Vol. 147. - P. 357-372.

110 MacKay V.L. and Manney T.R. Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic analysis of nonmating mutants // Genetics. - 1974. - Vol. 76. - P. 273-288.

111 Sprague G.F., Jensen Jr.R. and Herskowitz I. Control of yeast cell type by the mating type locus: Positive regulation of the α-specific STE3 gene by the MATαl product // Cell. - 1983. - Vol. 32. - P. 409-415.

112 Hartig A.J., Saari H.G. and MacKay V.L. Multiple regulation of STE2, a mating-type-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell. Biol. - 1986. - Vol 6. - P. 2106-2114.

113 Hicks J.B. and Herskowitz I. Interconversion of yeast mating types. I. Direct observations of the action of the homothallism (HO) gene // Genetics. - 1976. - Vol. 83. - P. 245-258.

114 Kassir Y. and Simchen G. Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region // Genetics. - 1976. - Vol. 82. - P. 187-206.

115 Goutte C. and Johnson A.D. al protein alters the DNA binding specificity of α2 repressor // Cell. - 1981. - Vol. 52. - P. 875-882.

116 Hawthorne D.C. Directed mutation of the mating type alleles as an explanation of homothallism in yeast // In.: Proceedings of the 11th international congress on genetics, 1963. - Vol. 1. - P. 34-35.

117 Winge O and Roberts C. A gene for diploidization in yeasts // C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol. - 1949. - Vol. 24. - P. 341-346.

118 Strathern J.N. and Herskowitz I. Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast // Cell. - 1979. - Vol. 17. - P. 371-381.

119 Hicks J.B., Strathern J.N. and Herskowitz I. The cassette model of mating-type interconversion // In.: DNA, insertion elements, plasmids and episomes. - New York: Cold Spring Harbor Laboratory. - 1977. - P. 457-462.

120 Haber J.E. and George J.P. A mutation that permits the expression of normally silent copies of mating type interconversions in homothallic strains of *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. - 1979. - Vol. 67. - P. 33-50.

121 Rine J., Strathern J.N., Hicks J.B., Herskowitz I. A suppressor of mating type in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating type loci // Genetics. - 1979. - Vol. 93. - P. 877-901.

122 Nasmyth K.A. and Tatchell K. The structure of transposable yeast mating type loci // Cell. - 1980. - Vol. 19. - P. 753-764.

123 Hicks J.B., Strathern J.N. and Klar A.J.S. Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae //* Nature. - 1979. - Vol. 282. - P. 478- 483.

124 Strathern J.N., Spatola E., McGill C. and Hicks J.B. Structure and organization of transposable mating type cassettes in *Saccharomyces cerevisiae //* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1980. - Vol. 77. - P. 2839-2843.

125 Nasmyth K.A., Tatchell. K., Hall B.D., Astell C. and Smith M. A physical analysis of mating type loci in *Saccharomyces cerevisiae //* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. - 1981. - Vol. 45. - P. 961-981.

126 Caroline R.A., Ahlstromllonasson L., Smith M., Tatchell K., Nasmytht K.A. and Hall B.D. The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae* // Cell. - 1981. - Vol. 27. - P. 15-23.

127 Strathern J., Hicks J. and Herskowitz I. Control of cell type in yeast by the mating type locus: the α1-α2 hypothesis // J. Mol. Biol. - 1981. - Vol. 147. - P. 357-372.

128 Russell D.W., Jensen R., Zoller M.J., Burke J., Errede B., Smith M. and Herskowitz I. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* HO gene and analysis of its upstream regulatory region // Molecular and cellular biology. - 1986. - Vol. 6, № 12. - P. 4281-4294

129 MacKay V.L. and Manney T.R. Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic analysis of non-mating mutants // Genetics. - 1974. - Vol. 76. - P. 273-288.

130 Strathern J., Hicks J. and Herskowitz I. Control of cell type in yeast by the mating type locus: The al-α2 hypothesis // J. Mol. Biol. - 1981. - Vol. 147. - P. 357-372.

131 Sprague. G.Jr., Rine J. and Herskowitz I. Control of yeast cell type by the mating type locus: I. Identification and control of expression of the a-specific gene BAR1 // J. Mol. Biol. - 1981. - Vol. 153. - P. 323-335.

132 Cameron J.R., Dawis R.W. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast // Cell. - 1979. - Vol. 16. - P. 739 -751.

133 Garfinkel D.J. Retroelements in Microorganisms. - N.Y.: Plenum press, 1993. - P. 107-136.

134 Merkulov G.V., Swiderek K.M., Baker B.C., Boeke J.D. A critical proteolytic cleavage site near the C terminus of the yeast retrotransposon Ty1 Gag protein // J. Virol. - 1996. - Vol. 70. - P. 5548 - 5556.

135 Warmington J.R., Waring R.B., Newlon C.S., Indge K.J., Oliver S.G. Nucleotide sequence characterization of Ty1-17, a class II transposon from yeast // Nucleic Acids Research. - 1985. - Vol. 13. - P. 6679-6693.

136 Hansen L.J., Sandmeyer S.B. Characterization of a transpositionally active Ty3 element and identification of the Ty3 integrase protein // J. Virol. - 1990. - Vol. 64. - P. 2599 - 2607.

137 Janettzky B.L., Lehle L. Ty elements of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. - 1992. - Vol. 267. - P. 19798 - 19805.

138 Kato H., Matsuda F., Yamada R., Nagata K., Shirai T., Hasunuma T. and Kondo A. Cocktail δ-integration of xylose assimilation genes for efficient ethanol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2013. - Vol. 116, No. 3. - P. 333e336.

139 Dujon B., Sherman D., Fischer G., et al. Genome evolution in yeasts // Nature. - 2004. - Vol. 430. - P. 35-44.

140 Liti G., Carter D.M., Moses A.M., et al. Population genomics of domestic and wild yeasts // Nature. - 2009. - Vol. 458. - P. 337-341.

141 Libkind D., Hittinger C.T., Valerio E., Goncalves C., Dover J., Johnston M., Goncalves P., Sampaio J.P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast // Proc Natl Acad Sci USA. - 2011. - Vol. 108. - P. 14539 -14544.

142 Dunn B. and Sherlock G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus* // Genome. - 2008. - Vol. 18. - P. 1610-1623.

143 Lang G.I. and Murray A.W. Estimating the per-base-pair mutation rate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. - 2008. - Vol. 178. - P. 67-82.

144 Mortimer R.K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome // Genome. - Vol. 10. - P. 403-409.

145 Mortimer R.K. and Johnston J.R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center // Genetics Res. - 1986. - Vol. 113. - P. 35-43.

146 Hall C., Brachat S. and Dietrich F.S. Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae* // Eukaryot Cell. - 2005. - Vol. 4. - P. 1102-1115.

147 Novo M., Bigey F., Beyne E., et al. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 // P Natl Acad Sci USA. - 2009. - Vol. 106. - P. 16333-16338.

148 Galeote V., Novo M., Salema-Oom M., Brion C., Valerio E., Goncalves P. and Dequin S. FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H+ symporter // Microbiology. - 2010. - Vol. 156. - P. 3754-3761.

149 Thomson J.M., Gaucher E.A., Burgan M.F., De Kee D.W., Li T., Aris J.P. and Benner S.A. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast // Nat Genet. - 2005. - Vol. 37. - P. 630-635.

150 Lindegren C.C. Chromosome maps of *Saccharomyces //* Hereditas. - 1949. - Vol. 35. - P. 338-355.

151 Kishimoto M. Fermentation characteristics of hybrids between the cryophilic wine yeast *Saccharomyces bayanus* and the mesophilic wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J Ferment Bioeng. - 1994. - Vol. 77. - P. 432-435.

152 Marullo P., Mansour C., Dufour M., Albertin W., Sicard D., Bely M. and Dubourdieu D. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach // FEMS Yeast Res. - 2009. - Vol. 9. - P. 1148-1160.

153 Marullo P., Bely M., Masneuf-Pomarede I., Pons M., Aigle M. and Dubourdieu D. Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model // FEMS Yeast Res. - 2006. - Vol. 6. - P. 268-279.

154 Hammond J.R.M. Yeast Genetics // In.: Brewing Microbiology. - New York:, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. - Vol. 3. - P 67-112.

155 Tubb R.S., Searle B.A., Goodey A.R. and Brown A.J.P. Rare mating and transformation for construction of novel brewing yeasts // Proc 18th Congr Eur Brew Conv. - 1981. - P. 487-496.

156 Kunicka-Styczynska A. and Rajkowska K. Physiological and genetic stability of hybrids of industrial wine yeasts *Saccharomyces* sensu stricto complex // J Appl Microbiol. - 2011. - Vol. 110. - P. 1538-1549.

157 Higgins V.J., Bell P.J., Dawes I.W. and Attfield P.V. Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques // Appl Environ Microbiol. - 2001. - Vol. 67. - P. 4346-4348.

158 Santos C.N. and Stephanopoulos G. Combinatorial engineering of microbes for optimizing cellular phenotype // Curr Opin Chem Biol. - 2008. - Vol. 12. - P. 168-176.

159 Attfield P.V. and Bell P.J.L. Genetics and classical genetic anipulations of industrial yeasts // In.: Functional genetics of industrial yeasts. - Springer, 2003. - Vol. 1. - P. 17-56.

160 Kavanagh K. and Whittaker P.A. Application of protoplast fusion to the nonconventional yeast // Enzyme Microb Technol. - 1996. - Vol. 18. - P. 45-51.

161 Pina A., Calderon I.L. and Benitez T. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces* fermentati obtained by protoplast fusion // Appl Environ Microbiol. - 1986. - Vol. 51. - P. 995-1003.

162 Demain A.L. History of industrial biotechnology // In.: Industrial biotechnology: sustainable growth and economic success. - Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2010. - P. 17-77.

163 Rowlands R.T. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures // Enzyme Microb Technol. - 1984. - Vol. 6. - P. 3-10.

164 Rowlands R. Fungal technology // In.: The filamentous fungi. - Edward Arnold, London, 1983. - Vol. 4. - P. 346-372.

165 Kumari R. and Pramanik K. Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production // J Biosci Bioeng. - 2012. - Vol. 114. - P. 622-629.

166 Butler P.R., Brown M. and Oliver S.G. Improvement of antibiotic titers from *Streptomyces* bacteria by interactive continuous selection // Biotechnol Bioeng. - 1996. - Vol. 49. - P. 185-196.

167 Elena S.F. and Lenski R.E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation // Nat Rev Genet. - 2003. - Vol. 4. - P. 457-469.

168 Paquin C. and Adams J. Frequency of fixation of adaptive mutations is higher in evolving diploid than haploid yeast populations // Nature. - 193. - Vol. 302. - P. 495-500.

169 Dunham M.J., Badrane H., Ferea T., Adams J., Brown P.O., Rosenzweig F. and Botstein D. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae* // P Natl Acad Sci USA. - 2002. Vol. - 99. - P. 16144-16149.

170 Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino M.P., Voordeckers K. and Verstrepen K.J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity // FEMS Microbiol Rev. - 2014. - Vol. 38. - P. 947-995.

171 Henrissat B. A classifi cation of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // Biochem. J. - 1991. - Vol. 280. - P. 309 - 316.

172 Gautam S.P., Bundela P.S., Pandey A.K., Awasthi M.K., Sarsaiya S. Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain // Int J Microbiol. - 2012. - Vol. 2012. - P. 325907.

173 Joshi V., Pandey A. Biotechnology: food fermentation: microbiology, biochemistry, and technology. - Educational Publishers and Distributors, 1999, Vol. 1.

174 Wilson D.B. Cellulases and biofuels // Curr. Opin. Biotechnol. - 2009. - Vol. Vol. 20. P. 295-913.

175 Szijarto N., Szyngiel Z., Liden G., Reczey K. Dynamics of cellulose production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose // Appl Biochem Biotechnol. - 2004. - Vol. 113-116. - P. 115-124.

176 Diagram. - Режим доступа: https://www.omicsonline.org/articles-images/2155-9600-6-461-g007.html (19.04.2017).

177 Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes // Curr Opin Struct Biol. - 1998. - Vol. 8. - P. 548-557.

178 Payne C.M., Knott B.C., Mayes H.B., Hansson H., Himmel M.E., et al. Fungal cellulases // Chem Rev. - 2015. - Vol. 115. - P. 1308-1448.

179 Hilden L., Johansson G. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity // Biotechnol Lett. - 2004. - Vol. 26. - P. 1683-1693.

180 Li Y., Wilson D.B Chitin binding by *Thermobifida fusca* cellulase catalytic domains // Biotechnol. Bioeng. - 2008. - Vol. 100. - P. 644 - 652.

181 Cohen R., Suzuki M.R., Hammel K.E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* // Appl. Environ. Microbiol. - 2005. - Vol. 71. - P. 2412-2417.

182 Mejia-Castillo T., Hidalgo-Lara M.E., Brieba L.G., Ortega-Lopez J. Purification, characterization and modular organization of a cellulose-binding protein, CBP105, a processive beta-1,4-endoglucanase from *Cellulomonas flavigena* // Biotechnol. Lett. - 2008. - Vol. 30. - P. 681 - 687.

183 Parsiegla G., Reverbel C., Tardif C., Driguez H., Haser R. Structures of mutants of cellulase Cel48F of *Clostridium cellulolyticum* in complex with long hemithiocellooligosaccharides give rise to a new view of the substrate pathway during processive action // J. Mol. Biol. - 2008. - Vol. 375. - P. 499-510.

184 Yoon J.J., Cha C.J., Kim Y.S., Kim W. Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola* // Biotechnol. Lett. - 2008. - Vol. 30. - P. 1373-1378.

185 Zverlov V.V., Schantz N., Schwarz W.H. A major new component in the cellulosome of *Clostridium thermocellum* is a processive endo-β-1,4-glucanase // FEMS Microbiology Letters. - 2005. - Vol. 249. - P. 353-358.

186 Zhang F., Bunterngsook B., Li J.-X., Zhao X.-Q., Champreda V., Liu C.-G., F.-W. Bai. Chapter three - regulation and production of lignocellulolytic enzymes from trichoderma reesei for biofuels production // Advances in Bioenergy. - 2019. - Vol. 4. - P. 79-119.

187 Teeri T.T. Crystalline cellulose degradation: New insights into the function of cellobiohydrolases // Trends Biotechnol. - 1997. - Vol. 15. - P. 160 - 167.

188 Koivula A., Ruohonen L., Wohlfahrt G., Reinikainen T., et al. The active site of cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*: The roles of aspartic acids D221 and D175 // J. Am. Chem. Soc. - 2002. - Vol. 124. - P. 10015- 10024.

189 Vocadlo D.J., Davies G.J. Mechanistic insights into glycosidase chemistry // Curr. Opin. Chem. Biol. - 2008. - Vol. 12. - P. 539-555.

190 Zhang X.-Z. and Zhang Y.-H.P. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications // In.: Bioprocessing technologies in biorefi nery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers. - John Wiley & Sons, Inc., 2013. - P. 131-145.

191 Kubicek C.P., Messner R., Gruber F., Mach R.L., Kubicek-Pranz E.M. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus // Enzyme Microb Technol. - 1993. - Vol. 15. - P. 90-99.

192 Galazka J.M., Tian C., Beeson W.T., Martinez B., Glass N.L., Cate J.H. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production // Science. - 2010. - Vol. 330, No. 6000. - P. 84-86.

193 Kim H., Lee W.H., Galazka J.M., Cate J.H.D. Jin Y.S. Analysis of cellodextrin transporters from *Neurospora crassa* in *Saccharomyces cerevisiae* for cellobiose fermentation // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2014. - Vol. 98, No. 3. - P. 1087-1094.

194 Lian J., Li Y., HamediRad M., Zhao H. Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in

Saccharomyces cerevisiae // Biotechnology and Bioengineering. - 2014. - Vol. 111, No. 8.

195 Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H. and Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // Microbiol Mol Biol Rev. - 2002. - Vol. 66, No. 3. - P. 506-577.

196 Taipakova S.M., Smekenov I.T., Saparbaev M.K. and Bissenbaev A.K. Characterization of *Aspergillus niger* endo-1,4-β-glucanase ENG1 secreted from *Saccharomyces cerevisiae* using different expression vectors // Genetics and Molecular Research. - 2015. - Vol. 14, No. 2, P. 6439-6452.

197 Voth W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the HO locus // Nucleic Acids Res. - 2001. - Vol. 29, №12. - P. E59.

198 Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-b-1,4-β-glucanase from Aspergillus niger and its expression in yeast // J Biosci Bioeng. - 2001. - Vol. 92. - P.434-441.

199 Smekenov I., Bakhtambayeva M., Bissenbayev K., et al. Heterologous secretory expression of β-glucosidase from *Thermoascius aurantiacus* in industrial *Saccharoimyces cerevisiae* strains // Braz J Microbiol. - 2019. - Режим доступа: https://doi.org/10.1007/s42770-019-00192-1 (29.11.2019).

200 Тайпакова С.М. Молекулярное клонирование и оптимизация экспрессии генов грибных термостабильных целлюлолитических ферментов: дис. на соискание ученой степени «доктора философии» (PhD) - Алматы. - 2011. - 103 с.

201 Harju S., Fedosyuk H. and Peterson K.R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab // BMC Biotechnology. - 2004. - Vol. 4. - P. 8

202 Li H., Wu M., Xu L., Hou J., Guo T., Bao X. and Shen Y. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production // Microbial Biotechnology/ - 2015. - Vol. 8, № 2. - P. 266-274.

203 Gupthar A.S., Bhattacharya S. and Basu T.K. Evaluation of the maximum specific growth rate of a yeast indicating non-linear growth trends in batch culture // World Journal of Microbiology & Biotechnology. - 2000. - Vol. 16. - P. 613-616.

204 Flaugnatti N., Journet L. Identification of effectors: precipitation of supernatant material // In.: Bacterial protein secretion systems: Methods and protocols. - New York: Humana Press; Springer, 2017. - P. 459-464.

205 Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-254.

206 Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar//Anal. Chem. - 1959. - Vol. 31. - P. 426-428.

207 Hong J., Tamaki H., Kumagai H. Cloning and functional expression of thermostable β-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus //* Appl Microbiol Biotechnol. - 2007. - Vol. 73. - P. 1331-1339.

208 Irfan M., Abbas S., Baig S., Gulsher M., Nadeem M., Syed Q. Pretreatment: a potential technique to enhance the enzymatic hydrolysis // World J Agric Sci. - 2010. - Vol. 6. - P. 440-445.

209 Sikorski R.S., Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae //* Genetics. - 1989. - Vol. 122, No. 1. - P. 19-27.

210 Li C.H., Wang H.R. and Yan T.R. Cloning, purification, and characterization of a heat- and alkaline-stable endoglucanase B from *Aspergillus niger* BCRC31494 // Molecules. - 2012. Vol. 17. -P. 9774-9789.

211 Ghosh S.K., Hajra S. and Jayaram M. Faithful segregation of the multicopy yeast plasmid through cohesin-mediated recognition of sisters // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2007. - Vol. 104. - P. 13034-13039.

212 Jeon E., Hyeon J.E., Suh D.J., Suh Y.W., et al. Production of cellulosic ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* heterologous expressing *Clostridium thermocellum* endoglucanase and *Saccharomycopsis fibuligera* beta-glucosidase genes // Mol. Cells. - 2009. - Vol. 28. - P. 369-373.

213 Gao L., Gao F., Wang L., Geng C., et al. N-glycoform diversity of cellobiohydrolase I from *Penicillium decumbens* and synergism of nonhydrolytic glycoform in cellulose degradation // J. Biol. Chem. - 2012. - Vol. 287. - P. 15906-15915.

214 Maley F., et al. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases // Anal. Biochem. - 1989. - Vol. 180. - P.195-204.

215 Zhang Y., Yin H. and Lu H. Recent progress in quantitative glycoproteomics // Glycoconj. J. - 2012. - Vol. 29. - P. 249-258.

216 Chen L., Drake M.R., Resch M.G., Greene E.R., et al. Specificity of O-glycosylation in enhancing the stability and cellulose binding affinity of family 1 carbohydrate binding modules // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2014. - Vol. 111. - P. 7612-7617.

217 Quay D.H.X., Bakar F.D.A., Rabu A., et al. Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, EglA, in *Pichia pastoris* //African Journal of Biotechnology. - 2011. -Vol. 10, № 11. - P. 2101-2111.

218 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. - Vol. 68, № 4. - P. 1556-1560.

219 Бисенбаев А.К., Смекенов И.Т., Тайпакова С.М. Конструирование рекомбинантных штаммов дрожжей для получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья // Международная научно практическая конференция «Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоидустрию». - 2016 г. - С. 36-37.

220 Hong J., Wang Y., Kumagai H., Tamaki H. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes // J. Biotechnol. - 2007. -Vol. 130. - P. 114-123.

221 Njokweni A.P., Rose S.H., van Zyl W.H. Fungal β-glucosidase expression in *Saccharomyces cerevisiae* // J Ind Microbiol Biotechnol. - 2012. - Vol. 39. - P. 1445-1452.

222 Rios-Franquez F.J., Gonzalez-Bautista E., Ponce-Noyola T., Ramos-Valdivia A.C., et al. Expression of a codon-optimized β-glucosidase from *Cellulomonas flavigena* PR-22 in *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production from cellobiose // Arch Microbiol. - 2017. - Vol. 199. - P. 605-611.

223 Zhang L., Guo Z.-p., Hong J.-h., et al. Expressing β-glucosidase from *Saccharomycopsis fibuligera* in industrial ethanol producing yeast and evaluation of the expressing sufficiency // Ann Microbiol. - 2012. - Vol. 62. - P. 539-544.

224 Guo Z.-p., Zhang L., Ding Z.-y., Gu Z.-h., Shi G.-y. Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose // Enzyme and Microbial Technology. - 2011. Vol. 49. - P. 105-112.

225 Смекенов И.Т., Куанбай А.Қ., Бурибаева А.С., Тайпакова С.М., Бисенбаев А.К. Экспрессия кДНК β-глюкозидазы гриба *Thermoascus aurantiacus* в *S. cerevisiae* // Доклады НАН РК. - 2016. - Том 2, № 306. - С.128-136

226 De Baetselier A., Vasavada A., Dohet P., Ha-Thi V., et al. Fermentation of a yeast producing *Aspergillus niger* glucose oxidase: scale-up, purification and characterization of the recombinant enzyme // Nat Biotechnol. - 1991. - Vol. 9. - P. 559-561.

227 Ziv N., Siegal M.L., Gresham D. Genetic and nongenetic determinants of cell growth variation assessed by high-throughput microscopy // Mol Biol Evol. - 2013. - Vol. 30. - P. 2568-2578.

228 Favaro L., Basaglia M., Trento A., Van Rensburg E., Garcia-Aparicio M., Van Zyl W.H., Casella S. Exploring grape marc as trove for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production // Biotechnology for Biofuels. - 2013. - Vol. 6. - P. 168.

229 Zambare V.P., Bhalla A., Muthukumarappan K., Sani R.K., Christopher L.P. Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile // Extremophiles. - 2011. - Vol. 15. - P. 611-618.

230 Bryksin A., Matsumura I. Overlap extension PCR cloning // Methods Mol. Biol. - 2013. - Vol. 1073. - P. 31-42.

231 Sola R.J., Griebenow K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals // J Pharm Sci. - 2009. - Vol. 98. - P. 1223-1245.

232 Bretthauer R.K., Castellino F.J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins // Biotechnol Appl Biochem. - 1999. - Vol. 30. - P. 193-200.

233 Adney W.S., Jeoh T., Beckham G.T., et al. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis // Cellulose . - 2009. - Vol. 16, No. 4. - P. 699-709.

234 Lopes D.D., Rosa C.A., Hector R.E., Dien B.S., Mertens J.A., Ayub M.A.Z. Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates// J Ind Microbiol Biotechnol. - 2017. - Vol. 44. - P. 1575-1588.

235 Romanh A., Pereira F., Johansson B., Domingues L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation // Bioresour Technol. - 2015. - Vol. 179. - P. 150-158.

236 Смекенов И.Т., Бахтамбаева М.К., Аюпов Т.И., Тайпакова С.М. Оценка устойчивости промышленных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к лигноцеллюлозным ингибирующим соединениям в процессе производства биоэтанола// Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». - 2018. - С. 218.

237 Chen Y., Stabryla L., Wei N. Improved acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the WHI2 gene identified through inverse metabolic engineering // Appl Environ Microbiol. - 2016. - Vol. 82, № 7. - P. 2156–2166.

238 Palma M., Guerreiro J.F., Sa-Correia I. Adaptive response and tolerance to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A physiological genomics perspective // Front Microbiol. - 2018. - Vol 9. - P. 274.

239 Olofsson K., Bertilsson M., Liden G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks // Biotechnol. Biofuels. 2008. - Vol. 1.

240 Xu Q., Singh A., Himmel M.E. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose // Curr. Opin. Biotechnol. - 2009. - Vol. 20. - P. 364-371.

241 Chauve M., Mathis H., Huc D., Casanave D., Monot F., Ferreira N. L. Comparative kinetic analysis of two fungal β-glucosidases // Biotechnol. Biofuels. - 2010. - Vol. 3. - P. 3.

242 Martins L.F., Kolling D., Camassola M., Dillon A.J., Ramos L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates // Bioresour Technol. - 2008. - Vol. 99. - P. 1417-1424.

243 Juwaied A.A., Al-amiery A.A.H., Abdumuniem Z., Anaam U. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* and *Tricoderma viride* using sugar cane waste // J. Yeast Fungal Res. - 2011. - Vol. 2, № 2. - P. 19-23.

244 Бурибаева А.С., Куанбай А.К., Смекенов И.Т., Тайпакова С.М. *Neurospora Crassa* саңырауқұлағының целлодекстриннің мембраналық тасымалдағыш (CDT1) генін *E. coli* жуйесінде клондау және экспрессиясын оптимизациялау // Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». - 2016. - С. 132.

245 Бахтамбаева М.К., Смекенов И.Т., Аюпов Т.И., Тайпакова С.М. Конструирование рекомбинантных штаммов дрожжей, коэкспрессирующих β-гликозидазу и переносчика целлодекстринов для получения биоэтанола из целлюлозы // Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». - 2018. - С. 190.

246 Smekenov I.T., Taipakova S., Bissenbaev A. Recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for bioconversion of cellobiose // Journal of Biotechnology. - 2017. - Vol. 256. - P. S111.

247 Бахтамбаева М.К., Смекенов И.Т., Тайпакова С.М. Создание генетически модифицированных промышленных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующих гены целлюлаз, для получения биоэтанола //

Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». - 2017. - С. 70.

248 Eriksen D.T., Hsieh P.C., Lynn P., Zhao H. Directed evolution of a cellobiose utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneously engineering multiple proteins // Microb Cell Fact. - 2013. - Vol. 12. - P. 61.

249 Heitmann M., Zannini E., Arendt E. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review // Crit Rev Food Sci Nutr. - 2018. - Vol 58, No. 7. - P. 1152-1164.

250 Denby C.M., Li R.A., Vu V.T, Costello Z., et al. Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer // Nat Commun. - 2018. - Vol. 9. - P. 965.

251 Zhang Y., Nielsen J., Liu Z. Engineering yeast metabolism for production of terpenoids for use as perfume ingredients, pharmaceuticals and biofuels // FEMS Yeast Research. - 2017. - Vol. 7, No 8. - P. fox080.

252 Bekatorou A., Psarianos C. and Koutinas A.A. Production of food grade yeasts food grade yeasts // Food Technol. Biotechnol. - 2006. - Vol. 44, No. 3. - P. 407-415.

253 Chen X., Jiang Z.-H., Chen S. and Qin W. Microbial and bioconversion production of d-xylitol and its detection and application // Int J Biol Sci. - 2010. - Vol. 6, No. 7. - P. 834-844.

254 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. - Vol. 9. - P. 32.

255 Тайпакова С.М., Смекенов И.Т., Бисенбаев А.К. Создание рекомбинантных штаммов дрожжей для получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья // Вестник КазНУ. - 2016. - Том 68, № 3. - С. 117-127.

256 Тайпакова С.М., Смекенов И.Т., Куанбай А.К., Бурибаева А.С., Бисенбаев А.К. Конструирование интегрального экспрессионного вектора направленный на НО локус хромосомы дрожжей // Известия НАН РК. - 2016. - Том 3, № 315. - С. 5-14

257 Смекенов И.Т., Куанбай А.К., Бурибаева А.С., Тайпакова С.М. Создание рекомбинантного штамма *Saccharomyces cerevisiae*, эффективно экспрессирующий гены целлюлаз для получения биотоплива // Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». - 2016. - С. 205.

258 Gietz R.D., Woods R.A. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method // Methods Mol Biol. - 2006. - Vol. 313. - P. 107-120.

259 Kassim E.A., El-Shahed A.S. Enzymatic and chemical hydrolysis of certain cellulosic materials // Agr. Wastes. - 1986. - Vol. 17. - P. 229-233.

260 Смекенов И.Т., Бахтамбаева М.К., Тайпакова С.М. Производство этанола рекомбинантным штаммом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* из авицел и соломы // Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». - 2019. - С. 184.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

УДОСТОВЕРЕНИЕ АВТОРА

№ 102228

Настоящим удостоверяется, что **Смекенов Изат Темиргалиевич (KZ)**

и **Тайпакова Сабира Мыктыбеккызы (KZ); Бисенбаев Амангельды Куанбаевич (KZ)**

является(ются) автором(ами) полезной модели

(11) 2796

(54) Интегративный плазмидный вектор для экспрессии генов в дрожжах

(73) *Патентообладатель:* Дочернее государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Казахский национальный университет им. аль-Фараби" Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)

(21) 2017/0230.2
(22) 07.04.2017

Вице-министр юстиции Республики Казахстан **Н. Пан**

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ

№ 102228

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

Смекенов Изат Темиргалиевич (KZ)

және **Тайпакова Сабира Мыктыбеккызы (KZ); Бисенбаев Амангельды Куанбаевич (KZ)**

пайдалы модельге авторы(лары) болып табылатындығы осымен куәландырылады

(11) 2796

(54) Гендерді ашытқыларда экспрессиялау үшін интегралды плазмидалық вектор

(73) ***Патент иеленушісі:*** **"Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің шаруашылық жүргізу құқығындағы "әл-Фараби" атындағы Қазақ Ұлттық университеті республикалық мемлекеттік кәсіпорнының шаруашылық жүргізу құқығындағы "Биология және биотехнология проблемалары ғылыми-зерттеу институты" еншілес мемлекеттік кәсіпорыны (KZ)**

(21) 2017/0230.2
(22) 07.04.2017

Қазақстан Республикасының
Әділет вице-министрі **Н. Пан**

KAZAKHSTAN PATENT