

REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES  
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 2224-5227

Volume 2, Number 306 (2016), 128 – 136

**THERMOASCUS AURANTIACUS B-GLUCOSIDASE  
EXPRESSION IN S. CEREVISIAE**

Smekenov I.T.<sup>1</sup>, Kuanbay A.K.<sup>2</sup>, Buribaeva A.C.<sup>3</sup>, Taipakova S.M.<sup>4</sup>, Bissenbaev A.K.<sup>5</sup>.

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

Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

**Kew words:**  $\beta$ -glucosidase, *Thermoascus aurantiacus*, *Saccharomyces cerevisiae* secretion, cellobiose, ethanol.

**Abstract.** By means of gene engineering methods, a recombinant plasmid YEGAp/alpha-bglI-flag was assembled. The vector carries  $\beta$ -glycosidase gene from *Thermoascus aurantiacus* with signal peptide of yeast  $\alpha$ -factor and FLAG-tag.  $\beta$ -glycosidase cDNA was expressed in *S.cerevisiae* strain FF18733 under control of GAPDH promoter. The recombinant enzyme is secreted into culture medium and effectively digests cellobiose. Recombinant strain *S. cerevisiae* FF18733/YEGAp- $\alpha$ -bglI-flag is able to grow in medium where cellobiose acts as the only carbon source. The strain produces ethanol in cellobiose containing medium in quantities comparable to ethanol production by non-transformed yeast in medium with glucose.

УДК: 577.216.3, 577.218

**ЭКСПРЕССИЯ КДНК  $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ  
ГРИБА THERMOASCUS AURANTIACUS В S. CEREVISIAE**

Смекенов И.Т.<sup>1</sup>, Куанбай А.К.<sup>2</sup>, Бурибаева А.С.<sup>3</sup>, Тайпакова С.М.<sup>4</sup>, Бисенбаев А.К.<sup>5</sup>.

ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии»  
КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Sabira.Taipakova@kaznu.kz; [Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz](mailto:Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz)

**Ключевые слова:**  $\beta$ -глюкозидаза, *Thermoascus aurantiacus*, *Saccharomyces cerevisiae*, секрция, целлюлоза, этанол.

**Аннотация.** С помощью генно-инженерных методов сконструирована рекомбинантная плазмида YEGAp/alpha-bglI-flag, включающий ген  $\beta$ -глюкозидазы *bglI* гриба *Thermoascus aurantiacus* с сигнальным пептидом  $\alpha$ -фактора дрожжей и flag-эпитопом. КДНК  $\beta$ -глюкозидазы экспрессирован под контролем конститутивного промотора GAPDH в *S. cerevisiae* штамма FF18733. Показано, что рекомбинантный фермент секретируется в культуральную среду и эффективно расщепляют целлюлозу. Показано, что рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* FF18733/YEGAp- $\alpha$ -bglI-flag обладает способностью к росту в среде с целлюлозой, добавленной в качестве единственного источника углеводов. Выявлено, что рекомбинантный штамм в среде с целлюлозой производит этанол сравнимый с количеством этанола производимыми нетрансформированными клетками дрожжей в среде с глюкозой.

**Введение.** Биологическая переработка целлюлозы является важным для развития альтернативной энергетики [1-5]. Целлюлоза является наиболее распространенным биологическим полимером. Она представляет собой линейный полимер, D-гликопиранозные остатки которого связаны  $\beta$ -1,4-глюкозидными связями. В зависимости от растительного источника степень полимеризации нативной целлюлозы может составлять приблизительно от 10 тыс. (у древесины) до 15 тыс. (у хлопка) [6]. Эффективная деструкция целлюлозы до растворимых сахаров, обычно требует совместное действие трех типов ферментов: эндо-1,4- $\beta$ -глюконазы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4- $\beta$ -глюконазы (КФ 3.2.1.91) и 1,4- $\beta$  глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) [2-5]. Эндо-1,4- $\beta$ -глюконазы

гидролизует внутренние  $\beta$ -1,4-гликозидные связи, экзо-1,4- $\beta$ -глюкозидазы (целлобиогидролазы) отщепляют целлобиозу с конца полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы и в свою очередь  $\beta$ -глюкозидазы расщепляет целлобиозу до глюкозы [7-9]. Эти ферменты известны как целлюлазы, которые проявляют синергизм для полного гидролиза целлюлозы до растворимых олигомерных и мономерных сахаров.

В настоящее время в качестве возможных продуцентов целлюлаз рассматриваются широкий спектр организмов, включая бактерий, грибы, насекомых и растения [10-12].

Среди микробных продуцентов целлюлаз сумчатые грибы *Thermoascus aurantiacus* играют ведущую роль. Грибы *Thermoascus aurantiacus* секретируют сложный набор целлюлитических ферментов и являются источником коммерческих целлюлитических препаратов, особенно в пищевой, текстильной и фармацевтической промышленности [13,14].

$\beta$ -1,4-гликозидаза является основным компонентом целлюлазного комплекса. Эффективность образования глюкозы из целлобиозы и их последующее ферментация в этанол зависит от  $\beta$ -1,4-гликозидазы. Однако, большая часть охарактеризованных  $\beta$ -1,4-гликозидаз сильно чувствительны к глюкозе, т. е. ингибируются конечным продуктом (глюкоза) по принципу обратной связи. В работе по биохимической характеристике  $\beta$ -1,4-гликозидаз грибов показано, что фермент, выделенный из *Thermoascus aurantiacus*, наибольшей эффективностью гидролизует целлобиозу и устойчив к действию глюкозы [15].

В настоящей работе ген  $\beta$ -1,4-гликозидазу *Thermoascus aurantiacus* (GenBank регистрационный номер DQ114397.1) клонирован под контроль конститутивного промотора глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*) и оптимизирована экспрессия этого гена в *S. cerevisiae*. Показано, что полученный рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* эффективно экспрессирует  $\beta$ -1,4-гликозидазу и ферментирует целлобиозу в этанол.

## Материалы и методы

### Материалы

Объектом исследования явились мицелии гриба *Thermoascus aurantiacus* семейства эуроциевых.

В ходе работы использовали клеточные линии: DH5 $\alpha$  для наработки плазмидной ДНК, экспрессионный штамм FF 18733 *S. cerevisiae*, а так же экспрессионный вектор YEGAp. Культивирование клеток *S. cerevisiae* проводили при 30°C в богатой среде YPAD, скрининг трансформантов проводили на синтетической минимальной селективной среде, включающей глюкозу и смеси аминокислот (среда SD DO -TRP). Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma», «Amresco», «Applichem» и «Реахим». А так же в ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (Германия), «New England Biolabs» (Франция), «Thermo Scientific» (Литва), «Promega» (США), «Roche» (США).

Таблица 1- Плазмиды использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
pMETalphaB	Сигнальный пептид ( $\alpha$ -фактор)	Invitrogen
pBAD/gIII A	Мyc-эпитоп, 6xHis*tag	Invitrogen
YEGAp	pGAPDH, tGAPDH	[16]
pESC-LEU2	pGAL10	Agilent
YEGAp/ $\alpha$ -MCS-myc-6xHis		[17]

### Электрофоретическое разделение белков в ДСН-ПААГ

Разделение белков по молекулярной массе проводили электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли в денатурирующих условиях [18].

Белковые образцы готовили кипячением в 2X буфере для образцов (2X:125мМ Tris-HCl pH

6,8, 10%  $\beta$ -меркаптоэтанола, 4% SDS, 0,02% бромфенолового синего, 20% глицерина) в течении 5 мин при 100°C. Далее 15 мкг образца белка нанесли на 5% концентрирующий гель и проводили концентрацию белков при 80V. Разделение белков осуществляли в 10% геле при 180V. В качестве электродного буфера использовали стандартный Трис-глициновый буфер pH 8,3 (25мМ Tris pH 8,3, 192мМ глицина, 0,1% SDS). После завершения электрофореза окрашивание гели проводили при комнатной температуре в растворе кумасси (50% метанол, 10% уксусная кислота, 0,25% Coomassie Blue R-250) в течении 1ч. Далее декантировали раствор для окрашивания и добавляли отмывочный раствор (10% метанол, 5% уксусная кислота). Гель отмывали, легко взбалтывая и помешивая жидкость до тех пор, пока зоны, свободные от белков, не станут прозрачными.

#### *Методы определения активности ферментов*

Трансформированные клетки культивировали в течение ночи в 20 мл минимальной селективной среды SD DO -TRP. Затем ночную культуру инокулировали в 1000 мл свежей среды и культивировали при 30 °C в течение 3 суток. Клетки собирали центрифугированием в течение 7 мин при 3000 x g, 20°C. Клетки ресуспендировали в 50мМ натрий-фосфатном буфере и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости с добавлением обработанной кислотой стеклянных бусинок диаметром 0,45мм. Клеточный лизат центрифугировали при 14000 x g в течение 30 мин. Культуральную жидкость использовали в качестве источника  $\beta$ -глюкозидазы. Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда [19], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

#### *Определение активности ферментов по отношению к *n*-нитрофенильным производным сахаров*

Ферментативную активность по отношению к *n*-нитрофенильному производному сахаров *n*-нитрофенил  $\beta$ -D-целлобиозиду (pNP-Cell) определяли в pH-оптimumе действия фермента при концентрации субстрата 8мМ и оптимальной температуре. 400 мкл смеси, содержащего 50мМ натрий-фосфатного буфера с pH-оптimumом действия фермента, 8мМ pNP-Cell или pNP-Lac прогревали при оптимальной температуре в течении 5 мин, и далее ферментативную реакцию начинали путем внесения 0,1мл предварительно разбавленного и подогретого таким же образом раствора фермента. Инкубацию реакционной смеси проводили в течение 1 часа. Затем реакцию останавливали путем добавления 2 мл 1М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Поглощение раствора измеряли на спектрофотометре на длине волны 420 нм относительно контрольного раствора приготовленного таким же образом, но без фермента. Количество выделившегося *n*-нитрофенила рассчитывали с использованием его коэффициента экстинкции, и далее рассчитывали ферментативную активность. За единицу активности принимали количество фермента, которое приводит к образованию 1мкМ *n*-нитрофенола (pNP) из субстрата за 1мин на мг тотального белка при данных условиях реакции.

#### *Определение выхода этанола*

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

#### **Результаты и их обсуждения**

Для выделения гена кодирующей  $\beta$ -1,4-гликозидазы *Thermoascus aurantiacus* нами были

конструированы две олигонуклеотидных праймера на основе данных о первичной структуре кДНК  $\beta$ -1,4-гликозидазы *T. aurantiacus*, имеющих в электронной базе данных GenBank (GenBank регистрационный номер DQ114397.1) [20]. Последовательности этих олигонуклеотидных праймеров следующее: смысловой праймер *bglI* Dir: 5'-aaAAGCTTCATATGAAGGATGACTTGGCC-3' и *bglI* Rev: 5'-aaGGATCCACTAGTCCGTAAGGGGGAAGCGG-3'.

Подчеркнутые нуклеотиды соответствуют сайтам рестрикции *Hind*III, *Nde*I и *Bam*HI, *Spe*I, соответственно. В результате был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около 2500 п.н. ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами *Nde*I и *Bam*HI по фланкирующим ген сайтам рестрикции и клонировали в обработанный теми же рестриктазами вектор pET32a под контроль промотора бактериофага T7. Полученный рекомбинантный вектор - pET32a/*bglI* - трансформировали в *E.coli*. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Секвенирование нуклеотидной последовательности клонированного гена *bglI* показало полное совпадение с нуклеотидной последовательностью *bglI* *Thermoascus aurantiacus*, опубликованной ранее [20]. Для подтверждения того, что ген *bglI*, кодирует  $\beta$ -1,4-гликозидазу, мы использовали экспрессионный штамм *E.coli*. Rosetta(DE3). Экспрессию гена *bglI* в трансформированных клетках выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Данные ДСН-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой 96,9 кДа, что соответствует рассчитанной молекулярной массе BGL1. Аналогичная белковая полоса не обнаруживалась в экстрактах клеток, несущих pET32a без вставки.

Для создания дрожжевого интегрального вектора с промотором глицеральдегид-дифосфат дегидрогеназы (GAPD), сигнальным пептидом  $\alpha$ -фактора дрожжей и гистидиновым тэгом нами были использованы несколько плазмидных векторов в качестве источников сигнального пептида, flag-эпитопа и 6xHis тэга (таблица 1). В первоначальных экспериментах мы клонировали кДНК ген *bglI* в плазмидный дрожжевой вектор pESC-LEU2 (рисунок 1). pESC-LEU2 вектор мы использовали в качестве источника flag-эпитопа. Для этого, плазмиду pET32a/*bglI* рестрицировали по сайту *Hind*III и обработали фрагментом Кленова для получения тупых концов. Затем полученный фрагмент кДНК гена *bglI* рестрицировали по сайту *Spe*I и клонировали в корпус вектора pESC-LEU2.

Необходимо отметить, что pESC-LEU2 вектор был предварительно рестрицирован по *Not*I и обработан фрагментом Кленова для получения тупого конца с одной стороны, с другой стороны рестрицирован по *Spe*I. В результате чего была получена рекомбинантная плаزمида pESC-LEU2/*bglI*-flag с кДНК геном *bglI* слитый с последовательностью flag-эпитопа на 3'-конце. Далее pESC-LEU2/*bglI*-flag обработали по сайтам рестрикции *Nde*I и *Pac*I и фрагмент длиной 2577 пар нуклеотидов, соответствующий длине кДНК *bglI* с последовательностью flag-эпитопа на 3'-конце, вырезали из агарозного геля, элюировали и лигировали в созданную нами YEGAp/ $\alpha$ -MCS-6xHis вектор, предварительно обработанной по тем же сайтам рестрикции (рисунок 1). Данный вектор содержит дрожжевой конститутивный промотор гена GAPDH. Кроме этого вектор YEGAp содержит ген *TRP1* для селекции трансформированных клеток, а также с сигнальный пептид  $\alpha$ -фактора дрожжей и гистидиновый тэг (6xHis). Продукты лигирования были трансформированы в хемикомпетентные клетки *E.coli* штамма DH5 $\alpha$ .

Трансформированные клетки, несущие вектор со вставкой, были выявлены по устойчивости к ампицилину. Плазмидная ДНК, выделенная из отобранных клеток, была проверена на наличие вставки методом ПЦР и рестрикционного анализа. Результаты рестрикционного и ПЦР анализа плазмиды представлены на рисунке 2. Как видно из рисунка 2А, плазмиды выделенные из клеток *E. coli*, трансформированных рекомбинантным YEGAp/ $\alpha$ -*bglI*-flag, при обработке эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI и *Pac*I, на 0,8% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной 7 т.п.н. и 3 т.п.н.. Первая из полос соответствовала длине плазмиды YEGAp без вставки, а вторая длине рекомбинантной конструкции  $\alpha$ -*bglI*-flag.

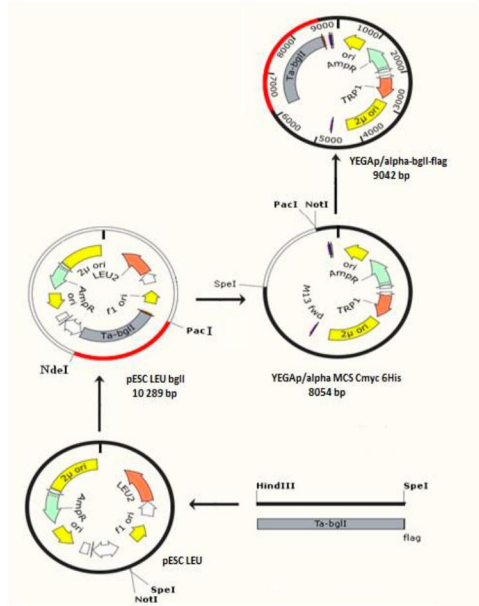
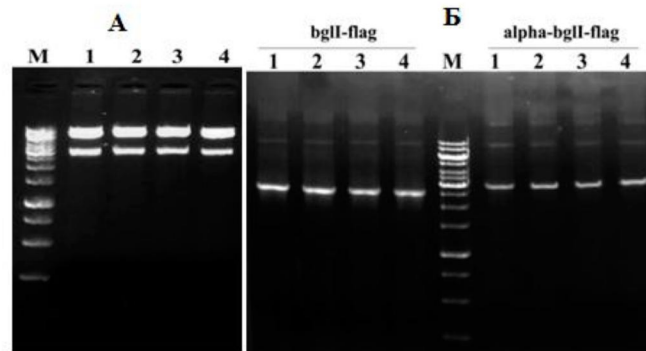


Рисунок 1 - Схема конструкции рекомбинантной плазмиды YEGAp/alpha-bglI-flag с кДНК геном *bglI* слитый с сигнальным пептидом  $\alpha$ -фактора дрожжей и flag эпитопом

Также нами был проведен ПЦР анализ с использованием ген специфических праймеров и плазмидных ДНК, выделенных из трансформантов, в качестве матрицы. Фрагменты, обнаруженные в результате агарозного геля - электрофореза полностью соответствовали длине клонированного кДНК гена *bglI* и конструкции  $\alpha$ -*bglI*-flag (рисунок 2Б)



А - Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды YEGAp/  $\alpha$ -*bglI*-flag; Б - ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды YEGAp/ $\alpha$ -*bglI*-flag. М- ДНК маркер; 1 - 4 клоны.  
Рисунок 2 - Анализ клонов, трансформированных YEGAp/ $\alpha$ -*bglI*-flag штаммов *E. coli* на наличие рекомбинантной плазмиды

Таким образом, эти данные указывают на то, что проанализированные колонии содержат плазмиды, несущие соответствующую конструкцию. В результате проведенных анализов нами были идентифицированы четыре клоны, несущих рекомбинантную плазмиду. Вставленные фрагменты были проверены на отсутствие мутаций секвенированием.

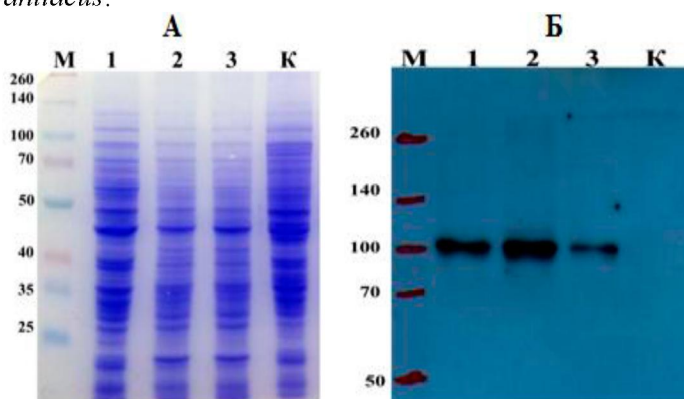
Несмотря на то, что последовательности аминокислот, установленные на основе нуклеотидной последовательности, полностью соответствовали клонированному нами *bglI* было необходимо продемонстрировать, кодирует ли на самом деле этот ген  $\beta$ -гликозидазу.

Для анализа экспрессии  $\beta$ -гликозидаз в дрожжевой системе под контролем конститутивного GAPD промотора, YEGAp/ $\alpha$ -*bglI*-flag вектор трансформировали в *S. cerevisiae* штамм FF 18733. Скрининг трансформантов проводили на селективной среде SD DO TRP supplement. В результате селекции было получено более двадцати колоний, из которых было отобрано три индивидуальных клонов. Отобранные трансформанты выращивали в 20 мл жидкой минимальной среды, в течение ночи при 30 °С. Ночную культуру переносили в большой объем минимальной среды и растили при

+30 °С в течение 72 часов.

Синтез рекомбинантных белков тестировали методом электрофореза в присутствии ДСН (рисунок 3). Для приготовления образцов дрожжевую массу лизировали на аппарате Omni Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer. Белковый экстракт получали центрифугированием лизата при 14000 об/мин в течении 40 мин, при температуре +4 °С. Для электрофоретического анализа использовали растворимые белки (супернатант). Результаты ДСН-ПААГ электрофореза показаны на рисунке 3А.

Данные ДСН-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой приблизительно 102 кДа в растворимой фракции. Однако с такой же молекулярной массой белковая полоса обнаруживалась в нетрансформированных клетках *S. cerevisiae*. Это указывает на то, что дрожжевые клетки содержат конститутивные белки с молекулярной массой аналогичной  $\beta$ -гликозидазе гриба *T. aurantiacus*.

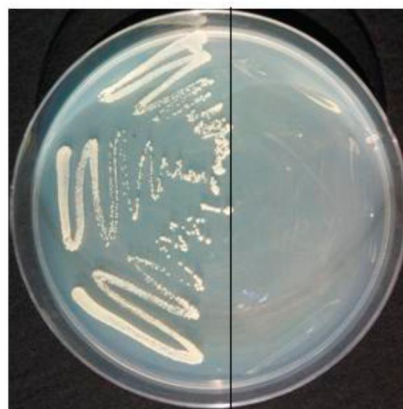


А- ДСН-ПААГЭ белков *S. cerevisiae*, трансформированных YEGAp/ $\alpha$ -bglI-флаг. Б- Вестерн блоттинг. М- Маркер; 1,3- клеточный экстракт *S. cerevisiae*, трансформированный YEGAp/ $\alpha$ -bglI-флаг; К- клеточный экстракт *S. cerevisiae*, несущий пустой вектор YEGAp.

Рисунок 3 - Экспрессия кДНК гена BGL1 гриба *Thermoascus aurantiacus* в *Saccharomyces cerevisiae*

В последующих экспериментах для доказательства экспрессии рекомбинантного BGLI *T. aurantiacus* использовали иммуноблоттинг с антителами анти-flag. Для этого белки из ДСН-ПААГ перенесли на PVDF мембрану и инкубировали с анти-flag антителами. Иммуноблоттинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной массой около 100 kDa, следовательно, эти данные указывают на эффективную экспрессию рекомбинантных CEL7A и BGLI в *S. cerevisiae*.

Для выяснения способности сконструированного нами рекомбинантного штамма использовать целлобиозу в качестве источника энергии, конструированные нами штаммы дрожжей выращивали в среде, содержащей целлобиозу в качестве единственного источника углеводов. Для этого трансформированные клетки FF 18733-YEGAp/ $\alpha$ -bglI-флаг методом штрихов посеяли на поверхность агаризованной минимальной среде с 2% целлобиозой. Результаты анализа приведены на рисунке 4. Как видно из рисунка клетки *S. cerevisiae* несущие рекомбинантную плазмиду YEGAp/ $\alpha$ -bglI-флаг синтезируют и секретируют белки проявляющие активность против целлобиозы о котором можно судить по их способности к росту в среде с целлобиозой, тогда как клетки трансформированные пустым YEGAp вектором не имели таковых, что указывает на то, что они не секретируют белки обладающие  $\beta$ -гликозидазной активностью.



FF18733/YEGAp FF18733/YEGAp  
alpha-bglI-flag

Рисунок 4 - Анализ секреции  $\beta$ -гликозидазы трансформированными клетками *S. cerevisiae* FF 18733-YEGAp-*bglI*-flag

Ферментативную активность по отношению к *n*-нитрофенильному производному сахаров *n*-нитрофенил  $\beta$ -D-целлобиозиду (pNP-Cell) определяли при pH-5 и оптимальной температуре 70°С, при концентрации субстрата 8мМ. В результате было показано, что рекомбинантный фермент BGLI может гидролизовать pNP-Cell ( $21,8 \pm 1,02$  ед/мг белка), что свидетельствуют о том, что рекомбинантный фермент имеет целлобиазную активность.

На следующем этапе решили проверить будет ли созданный нами штамм дрожжей ферментировать целлобиозу в этанол. Продукцию этанола определяли путем посева рекомбинантных штаммов дрожжей с оптической плотностью при 600 нм (ОД600) между 1 и 2 единицами в 250 мл встряхиваемую колбу с 50 мл среды, которая содержала 20% целлобиозы и/или 20% глюкозу. Культуры инкубировали при 30°С и 220 об./мин и продукцию этанола определяли каждые 12 часов. Содержание этанола анализировали согласно протоколу набора «Ethanol Kit» от «Megazyme». Полученные данные указывают на то, что способность продуцировать этанол в обогащенной среде с целлобиозой, повышается по мере увеличения времени инкубации. Интересно отметить, выход этанола производимые рекомбинантными дрожжами в среде с целлобиозой были сравнимы с количеством этанола производимыми нетрансформированными клетками дрожжей в среде с 2% глюкозой.

Рекомбинантные дрожжи, выращенные в среде с целлобиозой после 72 часов продуцировали 8,5г этанола на литр. Тогда как нетрансформированные родительские штаммы дрожжей, выращенные в среде с глюкозой, продуцировали этанол в количестве 7г. этанола на 1литр. Кроме того, рекомбинантные штаммы, выращенные в среде, содержащей целлобиозу и глюкозу показали более высокий выход этанола (12 г/л).

Таким образом, в результате проведенных нами работ был получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* содержащий рекомбинантную YEGAp/*alpha-bglI*-flag, активно экспрессирующий и секретирующий рекомбинантную бета-гликозидазу гриба *T. aurantiacus*, а также эффективный для ферментации целлобиозы в этанол.

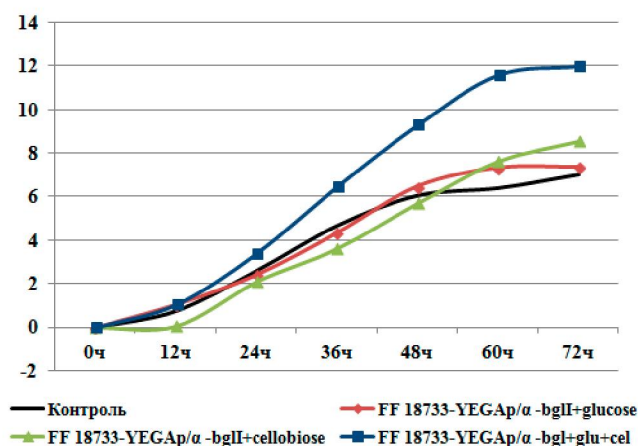


Рисунок 4- Определение выхода этанола во время ферментации субстрата рекомбинантным штаммом *S. cerevisiae* FF 18733-YEGAp/α-bglII-flag

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W., et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production // Science. -2007. -Vol.315, № 5813. -P. 804–807.
- [2] Birol F. World energy outlook 2010 // International Energy Agency. -2010.
- [3] 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, №2. -P.578-597.
- [4] Limayem A., Ricke S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects // Prog. Energy Combust Sci. - 2012. -Vol.38, №4. -P.449-467.
- [5] Mood S.H., Golfeshan A.H., Tabatabaei M., Jouzani G.S., Najafi G.H., Gholami M., et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment // Renew Sustain Energy Rev. -2013. -Vol.27. -P.77-93.
- [6] Сийницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. – М.: МГУ, 1995. - 224 с.
- [7] 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.
- [8] Turon X., Rojas O.J., Deinhammer R.S. Enzymatic kinetics of cellulose hydrolysis: a QCM-D study// Langmuir. - 2008. - Vol.24. -P.3880-3887.
- [9] Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G. Novel enzymes for the degradation of cellulose// Biotechnol. Biofuels. -2012. -Vol.5. -P.45.
- [10] Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology// Microbiol Mol. Biol. R. -2002. -Vol.66. -P.506-577.
- [11] Watanabe H., Tokuda G. Cellulolytic systems in insects // Ann. Rev. Entomol. -2010. -Vol.55. -P.609-632.
- [12] Hayashi T., Yoshida K., Park Y.W., Konishi T., et al. Cellulose metabolism in plants // Int. Rev. Cytol. -2005. - Vol.247. -P.1-34.
- [13] Bhat M.K., Parry N.J., Kalogiannis S., Beever D.E., Owen E., Nerinckx W., Claeysens M. Biochemical characterisation of cellulase and xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. In Carbohydrases from *T. reesei* and Other Microorganisms: Structures, Biochemistry and Applications (Proceedings of the Tricel '97 Meeting) (Claeysens, M., Nerinckx, W. and Piens, K., eds.)// Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K. -1998. -P.102–112.
- [14] McClendon S.D., Bath T., Petzold C.J., Adams P.D., Simmons B.A., Singer S.W. *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions// Biotechnology for Biofuels. -2012. - Vol.5. -P.54.
- [15] Cao L.-c.; Wang, Z.-j.; Ren, G.-h.; Kong, W.; Li, L.; Xie, W.; Liu, Y.-h. Engineering a novel glucose-tolerant β-glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration// Biotechnology for Biofuels. -2015. -Vol.8. -P.202.
- [16] 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.434-441p.
- [17] Тайпакова С.М., Смеженов И.Т., Куанбай А.К., Бурибаева А.С., Бисенбаев А.К. Конструирование интегрального экспрессионного вектора направленный на *Ho* locus хромосомы дрожжей// Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. -2016.
- [18] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// Nature. -1970. -Vol.227. -P.680-685.
- [19] Bradford M.M. 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.248-252.



[20] Hong J., Tamaki H., Kumagai H. Cloning and functional expression of thermostable beta-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*// Appl Microbiol Biotechnol. -2007. -Vol.73, №6. -P.1331-1339.

#### REFERENCES

- [1] Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W., et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, **2007**, 315(5813), 804–807 (in Eng.).
- [2] Birol F. World energy outlook 2010. International Energy Agency, 2010 (in Eng.).
- [3] 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**, 14(2), 578–597 (in Eng.).
- [4] Limayem A., Ricke S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust Sci.*, **2012**, 38(4), 449–467 (in Eng.).
- [5] Mood S.H., Golfeshan A.H., Tabatabaei M., Jouzani G.S., Najafi G.H., Gholami M., et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sustain Energy Rev*, **2013**, 27, 77–93 (in Eng.).
- [6] Sinicyn A.P., Gusakov A.B., Chernoglazov V.M. Bioconversion of lignocellulosic materials. M.: MGU, **1995**, 224 p. (in Russ.).
- [7] Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, 70, 1207-1212 (in Eng.).
- [8] Turon X., Rojas O.J., Deinhammer R.S. Enzymatic kinetics of cellulose hydrolysis: a QCM-D study. *Langmuir*, **2008**, 24, 3880-3887 (in Eng.).
- [9] Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels*, **2012**, 5 (in Eng.).
- [10] Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol R*, **2002**, 66, 506-577 (in Eng.).
- [11] Watanabe H., Tokuda G. Cellulolytic systems in insects. *Ann. Rev. Entomol.*, **2010**, 55, 609-632 (in Eng.).
- [12] Hayashi T., Yoshida K., Park Y.W., Konishi T., et al. Cellulose metabolism in plants. *Int. Rev. Cytol.*, **2005**, 247, 1-34 (in Eng.).
- [13] Bhat M.K., Parry N.J., Kalogiannis S., Beever D.E., Owen E., Nerinckx W. and Claeysens M. Biochemical characterisation of cellulase and xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. In Carbohydrases from *T. reesei* and Other Microorganisms: Structures, Biochemistry and Applications (Proceedings of the Tricel '97 Meeting) (Claeysens, M., Nerinckx, W. and Piens, K., eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K., **1998**, 102–112 (in Eng.).
- [14] McClendon S.D., Bath T., Petzold C.J., Adams P.D., Simmons B.A., Singer S.W. *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions. *Biotechnology for Biofuels*, **2012**, 5, 54 (in Eng.).
- [15] Cao L.-c.; Wang, Z.-j.; Ren, G.-h.; Kong, W.; Li, L.; Xie, W.; Liu, Y.-h. Engineering a novel glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. *Biotechnology for Biofuels*, **2015**, 8, 202 (in Eng.).
- [16] Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of a gene encoding a highly stable endo- $\beta$ -1,4- $\beta$ -glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 92, 434-441p. (in Eng.).
- [17] Таіпакова С.М., Сметенов І.Т., Қуанбай А.Қ., Бүрібаева А.С., Бісенбаев А.К. Construction of the integrated expression vector directed at the *HO* locus of yeast chromosome *News of the NAS RK, series biological and medical*, 2016 (in Russ.).
- [18] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-685 (in Eng.).
- [19] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248-252p. (in Eng.).
- [20] Hong J., Tamaki H., Kumagai H. Cloning and functional expression of thermostable beta-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **2007**, 73(6), 1331-1339 (in Eng.).

#### THERMOASCUS AURANTIACUS САҢЫРАУҚҰЛАҒЫНЫҢ $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗА КДҢҚ-СЫНЫҢ S. CERVISIAE КЛЕТКАСЫНДА ЭКСПРЕССИЯСЫ

Сметенов И.Т<sup>1</sup>, Қуанбай А.Қ<sup>2</sup>, Бүрібаева А.С<sup>3</sup>, Тайпакова С.М<sup>4</sup>, Бісенбаев А.К<sup>5</sup>

ЕМК «Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты»

аль-Фараби ат. ҚазҰУ, Алматы, Қазақстан

Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

**Тірек сөздер:**  $\beta$ -глюкозидаза, *Thermoascus aurantiacus*, *Saccharomyces cerevisiae*, целлюбиоза, этанол.

**Аннотация.** Гендік инженерия әдістерінің көмегімен құрамында ашытқылар  $\alpha$ -факторының сигналды пептиді және флаг-эпитобы бар *Thermoascus aurantiacus* саңырауқұлағының  $\beta$ -глюкозидаза *bglI* гені қосылған YEGAr/ $\alpha$ -*bglI*-флаг рекомбинантты плазмидасы құрастырылды.  $\beta$ -глюкозидаза кДҢҚсы *S. cerevisiae* FF18733 штаммында GAPDH конститутивті промоторы бақылауында экспрессияланды. Рекомбинантты ферменттің дақылдық ортаға секрецияланатындығы және целлюбиозаны эффективті түрде ыдырата алатындығы көрсетілді. *S. cerevisiae* FF18733/YEGAr- $\alpha$ -*bglI*-флаг рекомбинантты штаммы көмірсудің жаңғыз көзі ретінде қосылған целлюбиоза бар ортада өсуге қабілеттілігі көрсетілді. Рекомбинантты штамм целлюбиоза қосылған ортада глюкозалы қоректік ортада дақылданған трансформацияланбаған ашытқы клеткаларымен шамалас мөлшерде этанол өндіретіндігі айқындалды.

Поступила 12.03.2016 г.