УДК: 577.216.3, 577.218

С. М. ТАЙПАКОВА, А. К. БИСЕНБАЕВ

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ КДНК ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗЫ CEL7A ГРИБА *LENTINULA EDODES* В ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ И ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии
КазНУ им. аль-Фараби, г. Алматы

С использованием методов плазмидной трансформации на базе штамма-реципиента Rosetta(DE3) (E.coli) и YPH501a/α (S.cerevisiae), получены новые штаммы-продуценты эффективно экспрессирующие рекомбинантную целлобиогидролазу CEL7A гриба Lentinula edodes. Рекомбинантный фермент CEL7A показал максимальную активность в нейтральной среде (pH 7,0). Температурный профиль активности целлобиогидролазы L.edodes клонированной в дрожжах был сдвинут в область более высоких температур (70 °C) по сравнению с рекомбинантным ферментом, клонированными в E.coli (50°C). Показано, что термостабильность рекомбинантных целлобиогидролаз определяется характером гликозилирования.

Введение. В настоящее время основа процесса биоконверсии растительной биомассы состоит в ферментативном гидролизе целлюлозы до глюкозы с последующим сбраживанием ее в этанол или получении иных продуктов микробного синтеза. Природная древесина, отходы ее переработки, сельскохозяйственные целлюлозосодержащие отходы представляют потенциальный интерес как дешевое и возобновляемое сырье для получения различных химических продуктов и топлива [1].

Широкое практическое применение целлюлолитических ферментов в определенной степени ограничивается их природой, поскольку целлюлазные препараты, полученные из природных штаммов, как известно, представляют собой комплекс различных ферментов, имеющих зачастую довольно низкие специфические активности. Кроме того, при реальном применении целлюлаз зачастую возникает необходимость использования больших количеств фермента, чтобы достичь желаемого результата. Продуктивность же природных штаммов целлюлолитических грибов и бактерий, во многих случаях, слишком мала для промышленного получения целлюлаз.

В связи с этим клонирование генов кодирующих целлюлаз и повышение экспрессии их генов с использованием сильных и регулируемых промоторов, а также изучение свойств целлюлолитических и сопутствующих им ферментов, является задачей, имеющей большое научное и практическое значение.

Глубокая деструкция целлюлозы с образованием растворимых сахаров осуществляется под действием полиферментной системы целлюлаз, включающей в себя эндо-1,4-β-глюконазы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4-β-глюконазы (КФ 3.2.1.91), экзо-1,4-β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.74) и целлобиазы (КФ 3.2.1.21). Свойства индивидуальных ферментов, а также их взаимодействие в составе целлюлазного комплекса определяют его эффективность при гидролизе целлюлозосодержащих субстратов [1].

Ключевыми ферментами целлюлазного комплекса, ответственными за глубокий гидролиз кристаллической целлюлозы, являются экзо-1,4-β-глюконазы или целлобиогидролазы, основным продуктом действия которых является целлобиоза. Показано, что целлобиогидролаза образует до 60% глюкозы и 80% целлобиозы [2].

Большинство известных целлобиогидролаз гликозилированы. Предполагается, что гликозилирование целлюлаз обеспечивает защиту фермента от протеолитических ферментов [3], увеличивает

его термостабильность [4] и в некоторых случаях, возможно, играет важную роль в процессе адсорбции целлюлаз на нерастворимых субстратах [5].

Однако в клетках прокариот не происходят посттрансляционные модификации, в том числе гликозилирование и правильная укладка (фолдинг) полипептидных цепей многих эукариотических белков. Клетки дрожжей лишены подобных недостатков и имеют систему гликозилирования, которая важна для проявления функциональной активности рекомбинантных ферментов.

Известно, что дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* не способны синтезировать 1,4-β-гликозил гидролаз (целлобиогидролазу, целлодекстриназу и целлобиазу), способных гидролизовать до моносахаридов различные целлюлозные субстраты. Такая особенность данной системы намного облегчает регистрацию рекомбинантных целлобиогидролаз в трансформированных клетках. Кроме этого, способность *Saccharomyces cerevisiae* сбраживать глюкозу до этанола [6], позволяет использовать рекомбинантные штаммы для превращения целлюлозы одностадийным процессом в ряд ценных продуктов (углеводы, этанол и т. п.).

В настоящей работе мы предлагаем результаты клонирования и экспрессии гена целлобиогидролазы гриба *Lentinula edodes* в про- и эукариотических гетерологических системах и изучения физико-химических свойств рекомбинантного фермента.

Материалы и методы

Материалы. Ферменты рестрикции, Т4 ДНК-лигаза и Tag ДНК-полимераза фирмы Fermentas Life Sciences (Германия). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора High Pure Plasmid Isolation Kit, фрагменты ДНК очищали набором Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche Diagnostics GmbH. Германия). Все другие химические вещества и реактивы были аналитически чистыми (Sigma-Aldrich Corp, США). Для экспрессии использовали вектор pET11d (Invitrogen, США) и дрожжевой вектор YEpGAP.

Штаммы и условия культивирования. L. edodes (штамм №127) культивировали при комнатной температуре на тополиных опилках. Мицелии были собраны из опилок с помощью скальпеля. Образцы были объединены и замарожены в жидком азоте и хранились при -80°С до дальнейшего использования. Штамм *E. coli* DH5a использовали для наработки плазмиды. Штамм *E.coli* Rosetta (DE3) (Invitrogen, США) и YPH 501a/α *S.cerevisiae* использованы для экспрессии рекомбинантного CEL7A.

Иммуноблотинг с поликлональными антителами к CEL7A. Белки разделяли 10% ДСН-ПААГ электрофорезом. После завершения электрофореза белки окрашивали Кумасси R-250. Белковую полосу соответствующей молекулярной массе CEL7A вырезали из геля и использовали в качестве антигена. Кусок геля гомогенизировали в жидком азоте, эмульгировали в полном адъюванте Фрейнда (Sigma, США) и вводили подкожно кроликам. Вспомогательные инъекции антигена в неполном адъюванте Фрейнда проводились каждые две недели. У кролика брали образец крови до первой инъекции (преиммунная сыворотка), а затем через неделю после последней инъекции для получения иммунной сыворотки (анти-CEL7A антител). Вестерн блоттинг проводили по стандартному протоколу с использованием 1:400 анти-CEL7A поликлональных антител разведенных в блокирующем буфере и 1:10000 вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой.

Определение активности белка. Содержание белка определяли по методу Брэдфорда [7]. Ферментативную активность определяли с использованием авицел, карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и фильтровальной бумаги (Ватман № 1, 1х6 см) в качестве субстрата. Концентрацию восстанавливающих сахаров в растворе регистрировали спектрофотометрически методами динитросалициловой кислоты (DNS-метод) и методом Шомоди-Нельсона [8,9,10]. За единицу активности целлобиогидролазы принимали количество фермента, которое образует 1 мкМ восстанавливающих сахаров за 1 мин на 1 мг тотального белка.

Хромогенные субстраты р-нитрофенил β-D-лактопиранозид (pNP-Lac) и р-нитрофенил β-D-целлобиозид (pNP-Cel) так же были использованы в качестве субстрата. Концентрацию восстанавливающих сахаров в растворе регистрировали спектрофотометрически согласно методу Дешпанде. За единицу активности принимали количество фермента, которое освобождает из субстрата pNP-Cel или pNP-Lac 1мкМ п-нитрофенола (pNP) за 1мин на мг тотального белка при данных условиях реакции.

Результаты и обсуждения

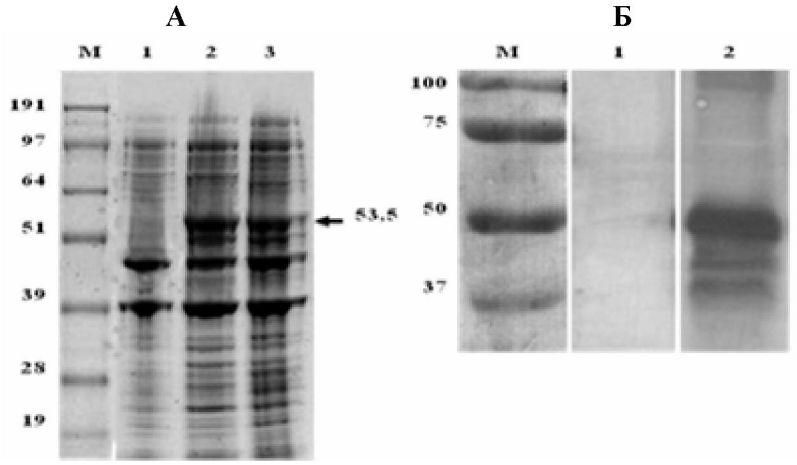
Для выделения гена кодирующей CEL7A нами были конструированы две олигонуклеотидных праймера на основе данных о первичной структуре кДНК *cel7A L. edodes*, имеющихся в электронной базе данных GenBank (GenBank регистрационный номер AF411250) [11]. Последовательности этих олигонуклеотидных праймеров следующее: смысловой праймер *cel7A*Dir: 5'-GATCACCATGGTCCGAACAGCAGC TCTCCTCT-3' и антисмысловой праймер *cel7ARev*: 5'-CTAGGATCCCTACAAACA TTGACTGTAGTAAGG-3'. Подчеркнутые нуклеотиды соответствуют сайтам рестрикции *Nco*I и *BamH*I, соответственно.

Препарат РНК выделяли из мицелия *L. edodes*, выращенных на тополиных опилках с использованием буфера СТАВ. С помощью обратной транскриптазы методом ОТ-ПЦР амплифицировали *cel7A* кДНК со специфическими праймерами. В результате был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около 1551 п.н. ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами *Nco*I и *BamH*I по фланкирующим ген сайтам рестрикции и клонировали в обработанный теми же рестриктазами вектор pET11d под контроль промотора бактериофага T7. Полученный рекомбинантный вектор - pET11d/cel7A - трансформировали в *E.coli*. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Секвенирование нуклеотидной последовательности клонированного гена *cel7A* показало полное совпадение с нуклеотидной последовательностью *cel7A L. edodes* штамма Stamets CS-2, опубликованной ранее [11].

Для подтверждения того, что ген *cel7A,* кодирует целлобиогидролазу, мы использовали экспресионный штамм *E.coli*. Rosetta(DE3). Экспрессию гена *cel7A* в трансформированных клетках выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, иммуноблотинга с поликлональными антителами, а также путем определения активности фермента.

После индукции в присутствии ИПТГ в течение 4-12 часов клетки лизировали и белковые образцы были приготовлены для ДСН-ПААГ электрофореза, кипячением в 2х образцовом буфере. Данные ДСН-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой 53,5 кДа, что соответствует рассчитанной молекулярной массе CEL7A. Аналогичная белковая полоса не обнаруживалась в экстрактах клеток, несущих pET11d без вставки (рис. 1А).

Белки из ДСН-ПААГ геля были перенесены на PVDF мембрану и инкубированы с поликлональными анти-CEL7A антителами. Иммуноблотинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной массой 53,5 кДа, что соответствует CEL7A (рис. 1Б).



А – ДСН-ПААГ электрофорез клеточного экстракта *E. coli* штамма Rosetta (DE3). М - Белковый маркер; 1 - экстракт *E. coli* несущий пустой вектор pET11d, 2 - экстракт *E. coli* несущий pET11d/*cel7A* через 4 ч индукции с ИПТГ, 3 - экстракт *E. coli* несущий pET11d / *cel7A* после 12 ч индукции с ИПТГ.
В – Вестерн блоттинг клеточного экстракта *E. coli* штамма Rosetta (DE3). М - Белковый маркер; 1 - экстракт *E. coli* несущий пустой вектор pET11d, 2 - экстракт *E. coli* несущий pET11d/*cel7A* после 12 ч индукции с ИПТГ.

Рис. 1. Экспрессия кДНК гена CEL7A гриба *L. edodes* в *E.coli*

Клетки *E. coli* являются удобными объектами генно-инженерных экспериментов. Однако данные клетки не способны гликозилировать синтезируемые ими белки (в том числе и эукариотические). Но многие эукариотические белки активны лишь в гликозилированном состоянии [12].

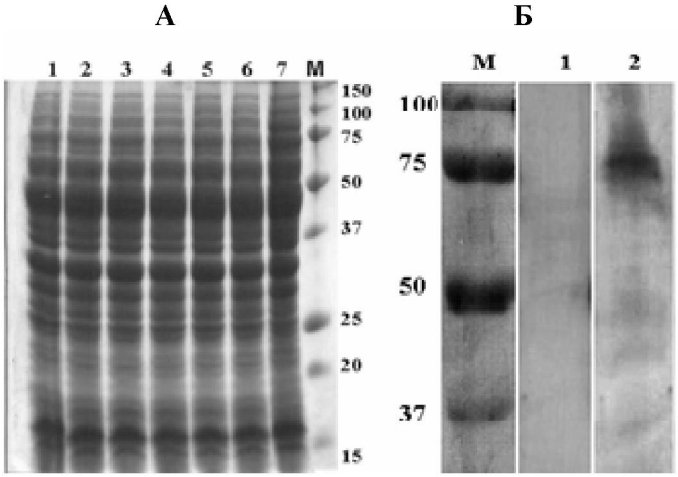
Дрожжи обладают всеми признаками эукариот и могут гликозилировать синтезируемые ими белки [13]. Для клонирования и экспресии обычно используют сахаромицеты - *Saccharomyces cerevisiae*. Они наиболее хорошо изучены с генетической точки зрения. У них на 17 хромосомах картировано около 650 генов [14]. В их клетках лишь в 3 раза больше ДНК, чем у бактерий, что позволяет относительно легко проводить скрининг клонов, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК.

Известно, что дрожжи *S. cerevisiae* не способны синтезировать 1,4-β-гликозил-гидролаз (целлобиогидролазу, целлодекстриназу и целлобиазу), способных гидролизовать различные целлюлозные субстраты до моносахаридов [6]. Такая особенность дрожжевой системы намного облегчает регистрацию рекомбинантных целлобиогидролаз в трансформированных клетках. В последующих экспериментах с использованием в качестве матрицы рекомбинантную плазмиду pET11d/*cel7A* нами амиплифицирован ген целлобиогидролазы CEL7A. Амплификацию гена *cel7A* проводили с помощью праймеров: смысловой праймер *cel7A* Pr 5'-TTAGCGGCCGCATGGTCCGAACAGCAGCTCTCC-3', и антисмысловой *cel7A* Pr5'-CAGGCCGCCTACAAACATTGACTGTAGTAAGG-3' праймер, содержащие сайт *Not*I (подчеркнуты).

Продукты ПЦР использовали для клонирования в дрожжевой вектор YEpGAP, содержащий сильный дрожжевой промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH обеспечивающий высокий уровень синтеза соответствующей мРНК и ген *TRP1* для селекции трансформированных клеток, по сайтам рестрикции *Not*I с сохранением рамки считывания.

Для анализа экспрессии целлобиогидролазы в дрожжевой системе под контролем конститутивного промотора, плазмидный вектор YEpGAP содержащий ген *cel7A* (YEpGAP/*cel7A*) трансформировали в *S. cerevisiae* штамм YPH 501a/α. Эффективность экспрессии гена рекомбинантной CEL7A анализировали с помощью ДСН-ПААГ электрофореза и иммуноблоттинга. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 2.

Белковые фракции трансформированных и нетрансформированных клеток *S. cerevisae* имели вытянутые размытые очертания на ДСН-ПААГ (рис. 2А). По представленным данным определить белковые полосы с молекулярной массой, характерной для CEL7A на ДСН-ПААГ, не представляется возможным. В связи с этим, в последующих экспериментах экспрессию рекомбинантного белка анализировали с помощью иммуноблотинга с поликлональными антителами CEL7A.



А - ДСН - ПААГ электрофорез трансформированных клеток *S.cerevisiae*;
1-3 - клеточный экстракт клонов, несущих плазмиду YEpGAP/*cel6B*; 4-6 - клеточный экстракт клонов, несущих плазмиду YEpGAP/*cel7A*; 7- клеточный экстракт *S.cerevisiae* без плазмиды; М- маркер молекулярной массы белка.
Б - Иммуноблотинг клеточных экстрактов рекомбинантных штаммов *S.cerevisiae,* несущей YEpGAP/*cel7A*.
М - маркер массы белка; 1 - клеточный экстракт *S.cerevisiae* без плазмиды; 2 - клеточный экстракт клонов, несущих плазмиду YEpGAP/cel7A.

Рис. 2. Экспрессия кДНК гена CEL7A гриба *L. edodes* в *S. cerevisae*

Результаты иммуноблотинга выявили мажорные белковые полосы молекулярной массой большей, чем рассчитанная молекулярная масса CEL7A *L. edodes* (см. рис. 2Б). Эти данные указывают на то, что CEL7A в трансформированных дрожжевых клетках представлен формой с более высокой молекулярной массой, чем CEL7A экспрессированный в *E. coli*.

Подобное увеличение молекулярной массы свойственно гликозилированным белкам, так как они часто представлены в виде набора различных по молекулярной массе гликоформ, отличающихся длиной и составом олигосахаридных цепей. Поскольку гликозилирование является распространенной посттрансляционной модификацией секретируемых белков, мы предположили, что рекомбинантный CEL7A также может содержать углеводные остатки. В связи с этим мы анализировали потенциальные сайты O- и N- гликозилирования с помощью программы O-GlycBase v6.00 (O-связанное гликозилирование) и NCBI (N-гликозилирования).

На основании анализа первичной структуры CEL7A мы обнаружили один потенциальный сайт N-гликозилирования в каталитическом домене в позиции 75 с N-конца белка (см. рис. 3). В то же время O-гликозилирование CEL7A потенциально может происходить в линкерной части по двум сайтам (451 серин и 472 треонин), а так же в каталитическом домене по 419 треонину. На основании полученных данных пришли к заключению, что рекомбинантная CEL7A *L. edodes* в трансформированных дрожжевых клетках гликозилирована.

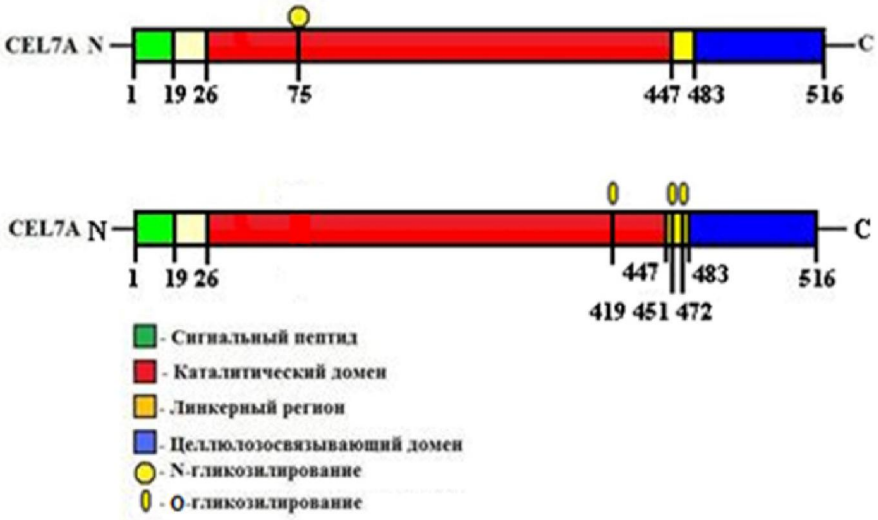
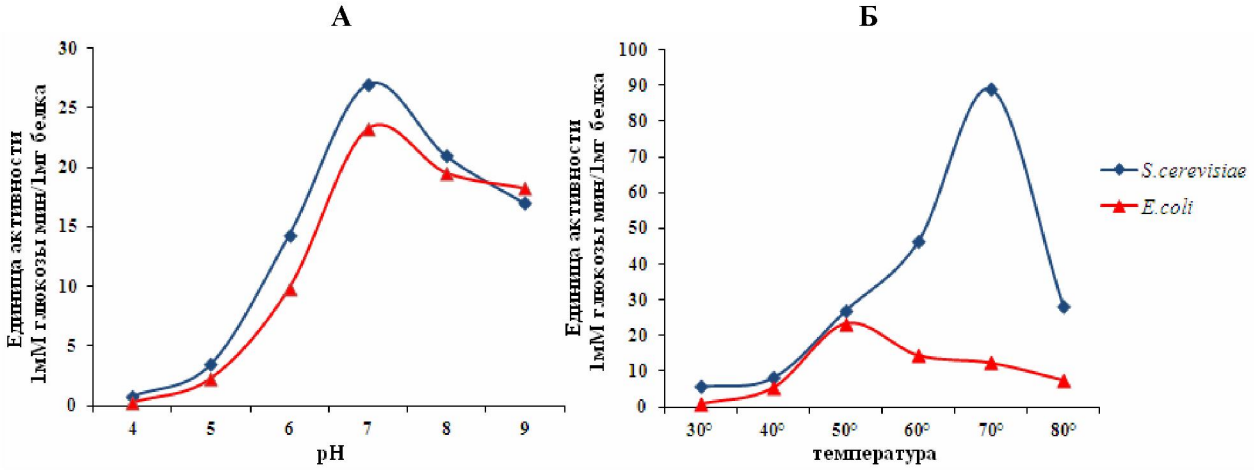


Рис. 3. Потенциальные сайты гликозилирование целлобиогидролазы CEL7A *L. edodes*

Таким образом, на данном этапе работы нами успешно были экспрессированы гены *cel7A* гриба *L. edodes* в *E.coli* и *S.cerevisiae* под контролем индуцебельного и конститутивного промотора. Результаты ДСН-ПААГ электрофореза и иммуноблоттинга показали, что CEL7A является основным белком, вырабатываемым в рекомбинантных штаммах бактерий и дрожжей. Выявлено, что CEL7A в трансформированных дрожжевых клетках представлен в гликозилированной форме на что указывает более высокая молекулярная масса, чем CEL7A экспрессированный в *E. coli*.

Эти данные указывают на то, что ген, кодирующий CEL7A, был успешно клонирован и экспрессирован в про- и эукариотической системе. Однако проявляет ли данный белок целлобиогидролазную активность? Для подтверждения того, что ген *cel7A*, кодирует целлобиогидролазу мы определяли активность клеточного экстракта *E. coli* и *S.cerevisiae* несущий pET11d/*cel7A* и YEpGAP/*cel7A* с использованием фильтровальной бумаги в качестве субстрата. Для этого клеточный экстракт *E. coli* (pET11d/*cel7A*) и *S.cerevisiae* (YEpGAP/*cel7A*) инкубировали при 50°C в течение 1 ч при разных значениях pH. Затем концентрацию восстанавливающих сахаров в растворе регистрировали DNS-методом и методом Шомоди-Нельсона.

Как видно из рис. 4А оптимальная каталитическая активность рекомбинантного фермента проявляется при pH 7. При этом необходимо отметить что, рекомбинантный фермент проявлял достаточно высокую активность в пределах значений pH от 8-9 как в *E. coli* так и в *S.cerevisiae* (рис. 4А).



А - pH оптимум был определен путем инкубации фермента при 50°С в течение 1 ч при разных значениях pH (натрий ацетатный буфер (pH 4-6), натрий фосфатный буфер (pH 6-7) и глициновый буфер (pH 9));
В - Температурный оптимум был определен путем инкубации фермента в 0,05М натрий-фосфатном буфере pH 7 в течение 1 ч в диапазоне температур от 30 до 80°С.

Рис. 4. Влияние разных значений pH и температуры на активность рекомбинантной CEL7A

Известно, что по сравнению с эндоглюканазами, целлобиогидролазы достаточно эффективно гидролизуют кристаллические субстраты, такие как фильтровальная бумага. Следовательно, результаты экспериментов показывают, что рекомбинантные штаммы *E. coli* и *S.cerevisiae* содержат активный фермент - целлобиогидролазу, который как было отмечено, гидролизует кристаллический субстрат в виде фильтровальной бумаги.

Необходимо отметить, что существует проблема экспрессии некоторых эукариотических генов в бактериях: экспрессированные рекомбинантные белки часто переходят в нерастворимое состояние, образуя тельца включения, которые в свою очередь биологически неактивны [16-18].

Большое количество генов целлюлаз бактерий и грибов были клонированы и экспрессированы в дрожжах и *E. coli* [19-21]. Однако экспрессия генов грибных целлюлаз в негликозилированной форме заканчивались незначительным успехом. Только несколько хорошо изученных генов *cbhI* и *egl3* гриба *T. Reesei* экспрессированы в *E. coli*. Однако биологическая активность этих рекомбинантных белков была очень низкой [22].

В наших экспериментах целлобиогидролаза CEL7A экспрессированная в *E. coli* проявляла достаточно высокую активность по отношению к фильтровальной бумаге и имела сравнительно одинаковую активность с рекомбинантным ферментом эксперессированным в *S.cerevisiae* при pH 7,0 и температуре 50°С (рис. 4-А и Б).

Иная картина наблюдалось при изучении температурной зависимости целлобиогидролазной активности рекомбинантного белка. Как видно из данных представленных на рисунке 4-Б в дрожжевой системе температурные профили активности рекомбинантной целлобиогидролазы CEL7A *L. edodes* сдвинуты в область более высоких температур (60-70°С) по сравнению с рекомбинантным ферментом, клонированным в *E. coli* (50°С). При этом активность рекомбинантного CEL7A в дрожжах при температуре 70°С приблизительно в 4 раза превышала активность фермента клонированного в *E. coli.*

Эти результаты указывают на то, что термоустойчивость рекомбинантного фермента, вероятно, достигается за счет гликозилирования.Далее нами проведен анализ субстратной специфичности рекомбинантного фермента экспрессированного в бактериях и дрожжах. Результаты представлены в таблице.

Изучалась способность рекобинантного CEL7A воздействовать на различные субстраты целлюлозной природы в оптимальных значениях pH. Рекомбинантный фермент экспрессированный как в *E.coli,* так и в *S.cerevisiae* расщеплял авицел, фильтровальную бумагу, но по отношению КМЦ проявлял низкую активность. Следовательно, наши данные по определению субстратной специфичности указывают на то, что рекомбинантный белок CEL7A действительно является целлобиогидролазой. Рекомбинантный белок также расщеплял хромогенные субстраты *p*NP-Lac и *p*NP-Cell.

Активность рекомбинантных целлобиогидролаз CEL7A и CEL6B на различных целлюлозных субстратах

Субстрат	Активность (ед мин/мг белка)	
	pET11d/cel7A *E.coli*	YEpGAP/cel7A *S.cerevisiae*
Авицел	21,38 ± 1,4	30,7±1,37
Фильтровальная бумага (Ватман №1, 1х6 см)	23,2 ± 0,3	89±4,19
КМЦ	2,9 ± 0,09	5±0,28
pNP-Lac	4.1 ± 0,08	3,25±0,13
pNP-Cell	3,8 ± 0,1	1,05±0,04

Примечание. Активность рекомбинантного фермента для pET11d/cel7A (*E.coli*) определяли при pH 7,0 и 50°C. При pH 7 и 70°C для фермента YEpGAP/cel7A (*S.cerevisiae*).

Таким образом, на основе векторов pET11d и YEpGAP были впервые созданы плазмидные конструкции, включающие в себя полинуклеотидные последовательности гена – целлобиогидролазы I (CEL7A) гриба *L. edodes* штамма N127. С использованием методов плазмидной трансформации на базе штамма-реципиента Rosetta(DE3) (*E.coli*) и YPH501a/α (*S.cerevisiae*), получены новые штаммы-продуценты эффективно экспрессирующие рекомбинантную целлобиогидролазу. Показано, что термостабильность рекомбинантных целлобиогидролаз определяется характером гликозилирования. Определение роли N-связанного и O-связанного гликозилирования в определении термоустойчивости рекомбинантной целлобиогидролазы *L. edodes* является предметом наших дальнейших экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1 Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. – М.: МГУ, 1995. – 224 с.

2 Teeri TT. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases // Trends in Biotechnology. – 15: 160-167. – 1997.

3 Voragen A.G.J., Beldman G., Rombouts F.M. Cellulases of a mutant strain of *Trichoderma viride* QM 9414 // J. Methods Enzymol. – 1988. – Vol. 160. – P. 363-368.

4 Stewart J.C., Heptinstall J. Cellulase and hemicellulase from *Aspergillus fumigatus Fresenius* // Methods Enzymol. – 1988. – Vol. 160. – P. 264-274.

5 Horikoshi K., Nakao M., Kurono Y., et al. Cellulases of an alkalophilic Bacillus strain isolated from soil // Can. J. Microbiol. – 1984. – Vol. 30. – P. 774-779.

6 Скиба Е.А., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. Сбраживание нецелевых гидролизатов с помощью *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693) // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4-1. – С. 180-183.

7 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. – 72: 248-252. – 1976.

8 Nelson NJ. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // J Biol Chem. – 153: 375-380. – 1944.

9 Somogyi M. Notes on sugar determination // J Biol Chem. – 195: 19-23. – 1952.

10 Miller G.L., Using dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar // Anal. Chem. – 31: 426-428. – 1959.

11 Lee CC, Wong DWS, Robertson GH. Cloning and characterization of two cellulase genes from *Lentinula edodes* // FEMS Microbiology Letters. – 205: 355-360. – 2001.

12 Glick B. R., Pasternak J J., Patten C.L. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA // 4-th edition. ASM press. – 2009. – P. 1000

13 Kukuruzinska M. A., Bergh M.L.E., Jackson B. J. Protein Glycosylation in Yeast // Annual Review of Biochemistry. – 1987. – Vol. 56. – P. 915-944.

14 Petes T. D. Molecular Genetics of Yeast // Annual Review of Biochemistry. – 1980. – Vol. 49. – P. 845-876.

15 Stewart J.C., Heptinstall J. Cellulase and hemicellulase from *Aspergillus fumigatus Fresenius* // Methods Enzymol. – 1988. – Vol. 160. – P. 264-274.

16 Guise A.D., West S.M., Chaudhuri J.B. Protein folding *in vivo* and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies // Mol. Biotechnol. – 1996. – Vol. 6. –P. 53-64.

17 Cardamone M, Puri N.K., Brandon M.R. Comparing the refolding and reoxidation of recombinant porcine growth hormone from a urea denaturation state and from *Escherichia coli* inclusion bodies // Biochem. – 1995. – Vol. 34. – P. 5773-5794.

18 Doyle WA, Smith AT. Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca+2 and haem // Biochem. J. – 1996. – Vol. 315. – P. 15-19.

19 Qiao Y., Mao A.J., He Y.Z., Liu W.F., Dong Z.Y. Secreted expression of *Trichoderma reesei* endo-glucanase II gene in *Pichia pastoris* and analysis of enzymatic properties // Mycosystema. – 2004. – Vol. 23, № 3. – P. 388-396.

20 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.

21 Hong J., Tamaki H., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of a gene encoding thermo-stable endo-b-1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast // Biotechnol Lett. – 2003. – Vol. 25. – P. 657-661.

22 Kyriacou A. MacKenzie C.R., Neufeld R.J. Detection and characterization of the specific and nonspecific endoglucanases of *Trichoderma reesei*: Evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase II // Enzyme and Microbial Technology. – 1987. – Vol. 9. – P. 25-32.

С. М. Тайпақова, А. К. Бисенбаев

LENTINULA EDODES САҢЫРАУҚҰЛАҒЫНЫҢ CEL7A ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗА ФЕРМЕНТІН ПРО- ЖӘНЕ ЭУКАРИОТТЫ ЖҮЙЕДЕГІ ДНҚ ЭКСПРЕССИЯЛАУ МЕН КЛОНДАУ ЖӘНЕ РЕКОМБИНАНТТЫ ФЕРМЕНТТЕРМЕН ФИЗИКА-ХИМИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Rosetta(DE3) (*E.coli*) және YPH501a/α (*S.cerevisiae*) рецепиент штамдары негізінде плазмидалық трансформация әдісін қолдану арқылы, *Lentinula edodes* саңырауқұлағаның CEL7A целлобиогидролаза ферментін тиімді түрде экспрессиялауға қабілетті жаңа продуцент-штамдар алынды. Рекомбинантты белок бейтарап ортада (pH 7,0) максималды белсенділік көрсететіні анықталды. Ашытқы жүйесінде экспрессияланған *L. edodes* rCEL7A ферменті белсенділігінің температуралық оптимумы *E. coli* жүйесінде клондалған рекомбинантты ферменттермен (50 °С) салыстырғанда жоғары температура көрсеткіштері (60-70°С) ауданына ығысатындығы анықталды. Гликолиздену деңгейі рекомбинантты целлобиогидролаза ферментінің термотұрақтылығын анықтайтындығы көрсетілді.

S. M. Taipakova, A. K. Bisenbayev

CLONING AND EXPRESSION OF DNA TSELLOBIOGIDROLAZY SEL7A OF MUSHROOM *LENTINULA EDODES* IN THE PRO-AND EUKARYOTIC SYSTEMS AND STUDYING OF THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF THE RECOMBINANT ENZYME

Using plasmid-based transformation of the recipient strain Rosetta (DE3) and YPH501 a/α, new producer strains efficiently expressing recombinant cellobiohydrolase CEL7A of the fungus *Lentinula edodes* have been obtained. The recombinant protein CEL7A showed maximal activity at pH 7.0. In the yeast expression systems the optimal temperature of *L. edodes* rCEL7A activity were shifted to higher values (70 °C) in compare with the recombinant enzyme cloned in *E. coli* (50 °C). It has been shown that the degree of glycosylation determines the thermal stability.