

УДК: 577.216.3, 577.218

¹С.М. Тайпакова, ¹И.Т. Смекенов, ²А.К. Бисенбаев*¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы²Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Создание рекомбинантных штаммов дрожжей для ферментации целлюлозосодержащего сырья

С использованием многокопийных плазмид и векторов для геномной интеграции получены новые штаммы дрожжей эффективно экспрессирующие эндо-1,4-β-глюканазу гриба *Aspergillus niger* и целлобиогидролазу CEL7A гриба *Lentinula edodes*. Создан интегральный вектор, способный включаться в HO locus хромосомы с селективным маркерным геном устойчивости к генетицину (G418), конститутивным промотором и терминатором дрожжевой глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). Показано, что подходы, использованные в данной работе, могут быть перспективными для конструирования промышленных штаммов для ферментации целлюлозосодержащего сырья.

Ключевые слова: целлобиогидролаза, эндо-1,4-β-глюканаза, *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессия гена, ферментативная активность, гликозилирование.

С.М. Тайпакова, И.Т. Смекенов, А.К. Бисенбаев

Целлюлозалы шикізатты ферментациялауда қолданылатын ашытқылардың рекомбинантты штамдарын алу

Көп көшірмелі плазмидалармен интеграцияланушы векторларды қолдана отырып, *Aspergillus niger* саңырауқұлағының эндо-1,4-β-глюканаза және *Lentinula edodes* целлобиогидролаза CEL7A ферменттерін эффективті түрде экспрессиялауға қабілетті жаңа ашытқы штамдары алынды. Генетицинге (G418) төзімділік көрсететін маркерлік ген KanMX4 пен ашытқы глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH) генінің конститутивті промоторы мен терминаторына ие, хромосоманың HO локусына интеграциялануға қабілетті интегральді вектор құрастырылды. Аталмыш жұмыста қолданылған амалдардың целлюлозалы шикізатты ферментациялауға қабілетті өндірістік штамдарды құрастыруда тиімділігі көрсетілді.

Түйін сөздер: целлобиогидролаза, эндо-1,4-β-глюканаза, *Saccharomyces cerevisiae*, ген экспрессиясы, ферментативтік белсенділік, гликозилдену.

S.M. Taipakova, I.T. Smekenov, A.K. Bissenbaev

Construction of recombinant yeast strains useful for fermentation of cellulose-containing material

Through the use of a multicopy plasmid and genomic integration vector, new yeast strains with high-level expression of heterologous endo-β-1,4-glucanase of the fungus *Aspergillus niger* and the *Lentinula edodes* cellobiohydrolase CEL7A were obtained. The vector carrying a selective marker gene resistant to geneticin (G418), a constitutive promoter and terminator of yeast gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was created for integration of genetic material into the chromosomal HO locus. Approaches used in this study have been shown to be perspective in the development of industrial strains for the fermentation of cellulose-containing materials.

Keywords: cellobiohydrolase, endo-1,4-β-glucanase, *Saccharomyces cerevisiae*, gene expression, enzymatic activity, glycosylation.

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].

В настоящее время целлюлитические ферменты используются в качестве добавок к детергентам и моющим средствам, целлюлозно-бумажной промышленности, в составе премиксов к кормам животных и птиц и даже в пищевой промышленности [2, 3]. В последнее время в связи с истощением запасов нефти и газа в энергетике широко обсуждаются проблемы применения технологии консолидированного биопроцесса гидролиза и сбраживания, т.е. прямой ферментации целлюлозосодержащего субстрата в этанол [4].

Широкое практическое применение целлюлитических 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 целлюлитических грибов и бактерий во многих случаях слишком мала для промышленного получения целлюлаз.

В связи с этим клонирование генов, кодирующих целлюлазы и повышение экспрессии их генов с использованием сильных и регулируемых промоторов, а также изучение свойств целлюлитических 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 [5].

В многочисленных работах грибные целлюлазные гены были клонированы и экспрессированы в штаммах *S. cerevisiae* [6,7]. Кроме этого, создан рекомбинантный штамм *S. Cerevisiae*, коэкспрессирующий три целлюлитических фермента (экзо-1,4-β-глюконазы, эндо-1,4-β-глюконазы и 1,4-β-глюкозидазы) и способный конвертировать аморфную целлюлозу в этанол [8]. Однако во всех выше перечисленных работах в качестве экспрессирующего вектора использовались эписомные, или плазмидные вектора.

Известно, что данный тип плазмид обычно трудно стабильно поддерживать в клетках, и они часто теряются из трансформированных клеток. Для того чтобы поддерживать цепь ДНК генов целлюлитических ферментов в дрожжах в более стабильном состоянии, ее следует вставить в генном дрожжей.

В данной работе для создания рекомбинантных штаммов дрожжей продуцентов целлюлаз выбран *S. cerevisiae*. Применение *S. cerevisiae* для производства этанола из гексозных сахаров (в частности глюкозы) широко распространено в промышленности [9]. Дрожжи *S. cerevisiae* обладают многими положительными качествами, делающими их подходящим объектом для промышленного использования в производстве биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья. *S. cerevisiae* могут с высокой эффективностью производить этанол из глюкозы (3,3 г/л в час) и проявляют толерантность к высоким содержаниям этанола в культуральной среде. Кроме этого, *S. cerevisiae* входит в список организмов, признанных безопасными (GRAS, generally recognized as safe). Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* не способны синтезировать 1,4-β-эндоглюканазу и целлобиогидролазу, что намного облегчает регистрацию рекомбинантного фермента в трансформированных клетках.

На основе многокопийных плазмидных векторов YEpGAP и pESC-LEU2 впервые созданы плазмидные конструкции, включающие в себя полинуклеотидные последовательности генов – целлобиогидролазы I (CEL7A) гриба *L. edodes* штамма N127 и 1,4-β-эндоглюканазы *Aspergillus niger*. С использованием методов плазмидной трансформации на базе штамма-реципиента YPH501a/a (*S.cerevisiae*) по-

лучены новые штаммы-продуценты, эффективно экспрессирующие рекомбинантные ферменты. Показано, что CEL7A под контролем индуцируемого галактозой промотора GAL10 не подвергается О-гликозилированию из-за присутствия глицина на N-конце потенциальных сайтов О-гликозилирования. Выявлено, что N-гликозилирование рекомбинантной CEL7A ингибируется галактозой, тогда как под контролем конститутивного GAPDH промотора фермент подвергается N-гликозилированию из-за отсутствия галактозы. Показано, что CEL7A экспрессированная в *S. cerevisiae* расщепляет авицел, фильтровальную бумагу, нитрофенил- β -D-лактопранозид (pNP-Lac) и p-нитрофенил- β -D-целлобиозид (pNP-Cel). Установлено, что в дрожжевой системе температурные профили активности N-гликозилированной CEL7A *L. edodes* сдвинуты в область более высоких температур (60-70°C) по сравнению с негликозилированными формами данного фермента.

В ряде работ [10] 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 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.

Ворт с соавторами [11] сообщили о создании нескольких интегральных дрожжевых векторов, способных включаться в хромосому дрожжей путем генного замещения с использованием участка гомологичной последовательности, *HO* гена. *HO* ген кодирует эндонуклеазу, ответственного за превращение клетки в клетку противоположного типа спаривания и инициирует диплоидизацию гаплоидных клеток [12]. Показано, что *HO* locus не требуется для роста дрожжей и практический все лабораторные и промышленные штаммы *S. cerevisiae* имеют мутации в данном локусе [13]. К сожалению, интегральные векторы, описанные в данной работе, не содержат промоторы и могут быть использованы

только для интеграции генов с собственными промоторами.

Нами создан экспрессионный интегральный вектор *HO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO* путем включения предварительно обработанного фрагментом Кленова HindIII-HindIII фрагмента (длиной 2.8 тпн) из *YEeGAP/eng1* плазмидного вектора, содержащей ген 1,4- β -эндоглюканазы *Aspergillus niger* (*eng1*) в SmaI сайт M4297 платформы (плазмида *HO-poly-KanMX4-HO*). Ген эндо-1,4- β -глюканаза гриба *Aspergillus niger* с целью стабильной экспрессии в дрожжах помещен под контроль хорошо известного конститутивного промотора и терминатора гена GAPDH. Кроме этого, в наших экспериментах использован маркерный ген устойчивости к антибиотик G418, что является доминантным и может обеспечивать селекцию трансформантов независимо от генотипа клетки-хозяина. Штаммы, сконструированные с использованием плазмид *pHO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO*, проверяли с помощью ПЦР для подтверждения интеграции гена *engI* в хромосому трансформированных клеток. Синтез эндо-1,4- β -глюканазы в трансформированных плазмидой *pHO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO* штаммах *S. cerevisiae* исследовали с помощью ДСН-ПААГ, методом зимографии с использованием красителя Конго красного и определения активности фермента с использованием карбоксиметилцеллюлозы в качестве субстрата.

Показано, что активность фермента в рекомбинантных штаммах, созданных с использованием многокопийных плазмид, немного выше, чем активность фермента, выявленная в штаммах дрожжей трансформированных плазмидой *pHO-GAPDH-eng1-KanMX4-HO*.

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.

Хотя в настоящей работе использованы лабораторные штаммы *S. cerevisiae*, описанные в настоящей работе, подходы могут быть вполне перспективными для конструирования промышленных рекомбинантных штаммов дрожжей для ферментации целлюлозосодержащего сырья.

Литература

- 1 Кастельянос О.Ф. Каталитические биохимические и биотехнологические свойства целлюлазного комплекса *Penicillium verruculosum* и его компонентов: дис. ...канд. хим. наук.- М.: МГУ, 1995. - 204с.
- 2 Godfrey, T., West S. *Industrial enzymology*. -2nd edition. -Macmillan Press Ltd., Hampshire, 1996. - 609 p.
- 3 Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // *Biotechnol. Adv.* - 2000. -V.18. - P.355-383.
- 4 Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J. E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // *Current Opinion in Biotechnology*. -2005. -V.16, № 5. –P. 577–583
- 5 Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: дис. ... канд. хим. наук. – М.: МГУ, 2006.
- 6 Mochizuki D., Miyahara K., Matsuzaki H., Hatano T., Fukui S., Miyakawa T. Overexpression and secretion of cellulolytic enzymes by δ -sequences of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Ferm. Bioeng.* -1994. – V. 77. – P. 468–473.
- 7 Van Zyl W.H., Pretorius I.S. Engineering yeast for efficient cellulose degradation // *Yeast*. -1998. - V.14. - P.67–76.
- 8 Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo H. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzymes// *Appl Environ Microbiol.* - 2004. - V.70. – P.1207–1212.
- 9 Ronald E. 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. –V. 38. – P.1193–1202.
- 10 Hong J, Wang Y, Kumagai H, Tamaki H Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes // *J Biotechnol.* - 2007. – V.130. – P.114-123.
- 11 Voth W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the HO locus // *Nucleic Acids Res.* - 2001. –V.29, №12.
- 12 Herskowitz I., Rine J., Strathern J. Mating type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*. Jones E.W., Pringle J.R., Broach J.R. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor - NY, 1992. - P. 583-656.
- 13 Baganz F., Hayes A., Marren D., Gardner D.C., Oliver S.G. Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. - 1997. – V.13. –P.1563–1573.

References

- 1 Kastel'janos O.F. Kataliticheskie biohimicheskie i biotehnologicheskie svojstva celljulaznogo kompleksa *Penicillium verruculosum* i ego komponentov: dis. ...kand. him. nauk.- MGU, 1995. -204s.
- 2 Godfrey, T., West S. *Industrial enzymology*. -2nd edition. -Macmillan Press Ltd., Hampshire, 1996. - 609 p.
- 3 Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // *Biotechnol. Adv.* -2000. -V.18. -P.355-383.
- 4 Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J. E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // *Current Opinion in Biotechnology*. -2005. -V.16, № 5. –P. 577–583
- 5 Skomarovskij A.A. Komponentnyj sostav i gidroliticheskaja sposobnost' fermentnogo kompleksa *Penicillium verruculosum*: dis. ... kand. him. nauk. - MGU, 2006.
- 6 Mochizuki D., Miyahara K., Matsuzaki H., Hatano T., Fukui S., Miyakawa T. Overexpression and secretion of cellulolytic enzymes by δ -sequences of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Ferm. Bioeng.* -1994. –V. 77. –P. 468–473.
- 7 Van Zyl W.H., Pretorius I.S. Engineering yeast for efficient cellulose degradation // *Yeast*. -1998. -V.14. -P.67–76.

8 Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo H. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzymes // *Appl Environ Microbiol.* -2004. -V.70. -P.1207–1212.

9 Ronald E. 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. -V. 38. -P.1193–1202.

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

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

12 Herskowitz I., Rine J., Strathern J. Mating type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression.* Jones E.W., Pringle J.R., Broach J.R. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor - NYk, 1992. -P. 583-656.

13 Baganz F., Hayes A., Marren D., Gardner D.C., Oliver S.G. Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast.* -1997. -V.13. -P.1563–1573.