

УДК 579.66:577.214.4:577.217.5

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОИНЖЕНЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ БИОТОПЛИВА

К.Г. Ли

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, г. Астана
lee11@mail.ru

Целлюлоза из биоотходов является наиболее привлекательным субстратом для производства высококачественной продукции (например, топлива или пластмассы) путем ферментации. Тем не менее, традиционная переработка биомассы является экономически неэффективным многоступенчатым процессом. До сих пор нет микроорганизмов, способных выполнять ферментацию одноступенчато (консолидированный биопроцессинг; СВР). Основной технической проблемой экономически эффективного производства целлюлозного биотоплива является необходимость снизить затраты на ферменты, разрушающие стенки растительных клеток (PCDE), которые необходимы для производства сахара из биомассы. Разработано несколько конкурентоспособных недорогих технологий для производства PCDE в различных организмах-хозяевах, таких как кишечная палочка, *Zymomonas mobilis* и некоторые растения. Возможна гетерологичная экспрессия PCDE в рекомбинантной *E. coli* или *Z. mobilis* и успешный консолидированный биопроцессинг в этих микроорганизмах. Экспрессия *in planta* дает возможность упростить процесс производства фермента и переработки растительной биомассы и приведет к самопроизвольной деструкции клеточных стенок растений. Хотя будущее имеющихся в настоящее время технологий трудно предсказать, их полная реализация, скорее всего, вероятно через интеграцию существующих подходов с развитием прорывных технологий.

Ключевые слова: целлюлазы, гетерологичная экспрессия, консолидированный биопроцессинг, биотопливо.

ВВЕДЕНИЕ

В течение многих десятилетий биологическая конверсия биомассы растений в биотопливо была одним из основных направлений многих исследований [1]. Растительная биомасса является наиболее распространенным возобновляемым источником углерода на Земле, а лигноцеллюлоза является его основным компонентом. Лигноцеллюлоза является весьма неоднородным субстратом, состоящим из целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Целлюлоза является линейным полимером глюкозы, молекулы которой прочно связаны друг с другом с помощью сильных внутримолекулярных водородных связей, формируя очень устойчивую структуру. Гемицеллюлоза представляет собой сложный гетерополимер, который включает в себя ряд полисахаридов, таких как ксилан, галактан и маннан. Гемицеллюлоза способствует неоднородности, в то время как целлюлоза вносит свой вклад в прочность лигноцеллюлозы. Лигнин содержит ароматические спирты и, как установлено, связан с целлюлозой и гемицеллюлозой. Лигнин защищает целлюлозу от гидролитических ферментов [2]. Традиционные подходы к извлечению простых сахаров из целлюлозы включают предварительную обработку в жестких условиях с последующим ферментативным осахариванием [3]. Затем извлеченные простые сахара могут быть преобразованы в технологичные виды биотоплива, сходные с топливом на основе нефти посредством использования рекомбинантных микроорганизмов [4].

Гидролиз биомассы остается единственным препятствием и дорогостоящей стадией в производстве целлюлозного топлива. В течение ряда лет акцент делался на разработку недорогих методологий получения гидролитических ферментов. Целлюлолитические микробы, выделенные из различных экологических ниш, являются источниками различных форм целлюлаз, и их идентификация способствует более глубокому пониманию механизма гидролиза лигноцеллюлозы. Огромный массив геномных данных подтвердил необходимость генно-инженерного совмещения нескольких групп целлюлаз (эндоглюканазы, целлобиогидролазы, экзоглюканазы и β -глюкозидазы) и гемицеллюлаз (ксиланазы и арабинофуранозидазы) с синергической активностью в одном рекомбинантном хозяине для обеспечения эффективного одношагового гидролиза трудноусвояемой растительной биомассы до простых сахаров [5]. Однако синтез нескольких

ферментов будет налагать огромную метаболическую нагрузку на модифицированный хозяйский организм. Отбор рекомбинантных хозяев для получения нескольких ферментов с высоким титром является необходимым условием для эффективного биопроцессинга целлюлозной биомассы. Появление генной инженерии и синтетической биологии позволило создать и развивать рекомбинантные растения и микроорганизмы, которые способствуют эффективному одноэтапному гидролизу лигноцеллюлозы [6]. Было разработано много конкурирующих технологий для гетерологичной экспрессии ферментов, разрушающих стенки растительных клеток (PCDE) в сочетании с одновременным биопроцессингом целлюлозной биомассы в различных организмах (например, кишечная палочка, грибы, дрожжи, *Zyotomonas mobilis* и растений). Важен выбор оптимального хозяйского организма, потому что каждый из них не только имеет свои уникальные особенности, но также имеет свои преимущества и недостатки для конкретного приложения. Таким образом, хорошее понимание уникальных особенностей каждой рекомбинантного организма-хозяина является необходимым для экспрессии гетерологичного PCDE. Проще говоря, консолидированный подход биопереработки предполагает использование рекомбинантных микроорганизмов, таких как кишечная палочка и *Z. mobilis*, которые способны гидролизовать и сбраживать растительную биомассу, в то время как подход *in planta* использует растения, способные производить PCDE, что предполагает автодеградацию растительной биомассы. В этой статье не только дается представление об экспрессии PCDE в трех различных организмах-хозяевах (кишечная палочка, *Z. mobilis* и растения), но также освещаются последние достижения в этой области.

ПРИРОДНЫЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ: СТРУКТУРА И РЕГУЛЯЦИЯ

Природные микроорганизмы, разрушающие стенки растительных клеток, синтезируют внеклеточные множественные ферментные системы. Эти системы имеют различную субстратную специфичность (например, целлюлазы, ксиланазы или пектиназы) и каталитические механизмы, которые могут быть свободными или клеточно-ассоциированными. Аэробные микроорганизмы, такие как нитчатые грибы (например, *Trichoderma reesei*) и актиномицеты, как правило, синтезируют свободные целлюлазы, которые не образуют стабильных комплексов [7]. Анаэробные бактерии, такие как *Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.*, и грибы (например *Chytridomycetes*) разработали комплекс целлюлазных систем называемых «целлюлосомами» [8]. Механизмы регуляции экспрессии генов целлюлаз оставались неясными в течение многих лет, потому что промоторы транскрипции не были найдены в рамках крупных кластеров генов. Тем не менее, наличие больших полицистронных оперонов было недавно продемонстрировано в *Clostridium cellulolyticum* [9]. 26 т.п.н. *cip-cel* кластер целлюлосомных генов *C. cellulolyticum* состоит, по меньшей мере, из 14 кб оперона и других небольших транскрипционных единиц, которые включают 1-5 генов. Было даже высказано предположение, что весь *cip-cel* кластер может быть одним опероном, транскрибирующимся целой первичной мРНК, которая затем преобразуется в различные вторичные транскрипты, обладающие различной стабильностью [9]. Еще два оперона, *celC*, состоящие из *celC-glyR3-licA* и *manB-celT*, были выявлены в *Clostridium thermocellum* [10]. Промотор *celC*-оперона подавляется GlyR3 и активируется, когда доступна ламинарибиоза (димер В-1,3 глюкозы). Кроме того, группа из шести предполагаемых альтернативных s-факторов и мембранно-связанных анти-s-факторов, которые могут играть роль в регуляции целлюлосомных генов, недавно была идентифицирована в *C. thermocellum* [11].

Гетерологичная экспрессия внеклеточных белков (например, целлюлаз или гемицеллюлаз) является ключевой особенностью рекомбинантных целлюлолитических стратегий (RCS), потому что они придают целлюлолитические способности микроорганизмам со свойством образования ценных продуктов. Хотя для эффективной транскрипции гена необходим выбор подходящего конститутивного или индуцибельного промотора, последний является лишь одним из нескольких механизмов, на уровнях как мРНК (т.е. стабильности мРНК и эффективности трансляции), так и белка (т.е. его стабильности, транспорта и активности), участвующих в экспрессии генов у микроорганизмов [9]. Такие механизмы были оптимизированы в природных организмах в процессе эволюции. Исследователи, которые хотят создавать новые (т.е. рекомбинантные) организмы, должны модулировать гетерологичную экспрессию генов, чтобы имитировать естественные механизмы, которые развились в результате мутаций и естественного отбора, или, по крайней мере, получать функциональные системы для предполагаемого промышленного применения (рис. 1). Это особенно трудно для RCS, поскольку они связаны с клонированием и экспрессией множества генов и транслокацией генных продуктов через клеточную оболочку, а также возможной посттрансляционной модификацией и прикреплением ферментов к поверхности клетки.

ОПТИМИЗАЦИЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

Выбор промотора. RCS осуществляется, в большинстве случаев, путем клонирования генов гетерологичных целлюлаз под контролем конститутивных промоторов [12]. Такая стратегия оказывается более подходящей для микроорганизмов, нацеленных на переработку биомассы, поскольку позволяет избежать дополнительных затрат на большое количество специфических индукторов. Тем не менее, неконтролируемый биосинтез гетерологичных целлюлаз может привести к насыщению механизмов трансмембранного транспорта с последующим тормозящим действием на рост и жизнеспособность клеток. Поэтому токсичность может быть уменьшена путем ослабления силы промотора путем направленного или случайного мутагенеза [12]. И напротив, индуцибельные промоторы могут быть использованы для задержки биосинтеза белка в фазе роста (например, в середине логарифмической фазы роста), который был бы нужнее для эффективного биосинтеза ферментов и уменьшения их токсического эффекта [13]. По мере увеличения степени понимания системы регуляции синтеза целлюлаз в природных микроорганизмах становится все более заманчиво имитировать такие модели в рекомбинантных организмах.

Регуляция на уровне стабильности мРНК. Концентрация мРНК – это баланс между транскрипцией генов и деградацией мРНК. Тонкая настройка деградации мРНК фактически используется прокариотами, чтобы модулировать экспрессию генов, например, экспрессию генов целлюлаз [9]. Увеличение стабильности мРНК может быть использовано в качестве дополнительного эффективного инструмента для усиления экспрессии гетерологичных целлюлаз, тем самым устраняя необходимость в трудоемких процедурах скрининга промотора. В некоторых случаях улучшение стабильности мРНК может быть даже более эффективно для секреции большого количества гетерологичных белков, чем при использовании сильных промоторов [14].

Модуляция эффективности трансляции. Содержание GC в геноме является основным фактором, определяющим модели использования кодонов и аминокислот, наблюдающиеся в разных группах бактерий. Поэтому следует принимать во внимание совместимость по GC-содержанию между донором и реципиентом штаммов для эффективной экспрессии гетерологичного белка. В этом отношении гетерологичную экспрессию пируватдекарбоксилазы (PDC) для создания штаммов-сверхпродуцентов этанола можно рассматривать как общую модель. PDC широко распространен в растениях, дрожжах и грибах, но редок в бактериях, и по этой причине PDC ген из *Zyotomonas mobilis* стал «рабочей лошадью» для геноинженерных работ в прокариотах, хотя и с весьма ограниченным успехом на грамположительных штаммах [15]. Talarico с сотрудниками [15] показали, что уровень гетерологичной PDC в *B. subtilis* зависит от содержания GC, то есть использования кодонов штаммом-донором PDC, хотя мРНК присутствует в равных концентрациях. Когда донорные штаммы с подходящим содержанием GC недоступны для данного гена, для оптимизации трансляции белка могут быть приняты две стратегии: (I) введение генов дополнительных тРНК в штамм-реципиент [16, 17]; и (II) дизайн синтетических генов с оптимизированным использованием кодонов, которое достигается путем замены редких кодонов оптимальными кодонами для рекомбинантного хозяина, что не влияет на аминокислотную последовательность продукта гена [18].

КОНСОЛИДИРОВАННЫЙ БИОПРОЦЕССИНГ

Подход консолидированного биопроцессинга (CBP) включает в себя инженерную целлюлолитическую способность в большинстве промышленно используемых растворителях (продуцирующих растворители), таких как дрожжи, кишечная палочка, и *Z. mobilis* для содействия одностадийному преобразованию растительной биомассы в топливо. Как описано выше, для деполимеризации растительной биомассы необходимо несколько ферментов. В дополнение к экспрессии нескольких целлюлолитических ферментов необходимо сконструировать надлежащую систему секреции белков в рекомбинантных микроорганизмах для обеспечения высокого титра внеклеточных ферментов. Без установления надлежащего взаимодействия между различными группами ферментов полученные продукты начнут накапливаться, что приведет к торможению дальнейшего гидролиза субстрата [3]. Кроме того, гидролиз биомассы растений активно протекает при более высокой температуре, в то время как большинство рекомбинантных хозяев являются мезофилами, и это представляет дополнительные препятствия в консолидированном биопроцессинге [7]. Необходимо скоординировать в одной клетке синтез ферментов, гидролиз субстрата и процесс ферментации таким образом, чтобы ни один не отставал или не перегонял другие процессы. С помощью мощных инструментов, предлагаемых синтетической биологией, системной биологией, структурной биологией, белковой инженерией, прилагаются усилия для устранения вышеупомянутых узких мест и разработки эффективных микроорганизмов для консолидированного биопроцессинга. С появлением surface-display технологии дрожжи стали вне конкуренции среди организмов-хозяев для синтеза целлюлаз. Однако у рекомбинантных хозяев,

таких как кишечная палочка и *Z. mobilis* недавно обнаружили много свойств, делающих их идеальными для продукции целлюлаз. Далее обсуждаются прилагаемые исследователями усилия и препятствия в области генной инженерии целлюлолитических способностей в *E. coli* и *Z. mobilis*.

ЭКСПРЕССИЯ И СЕКРЕЦИЯ ЦЕЛЛЮЛАЗ В *E. COLI*

Кишечная палочка является одним из любимых промышленных микроорганизмов и имеет высокий потенциал, чтобы стать консолидированным биопроцессором в связи с обилием знаний, относящихся к этому организму, что позволяет легко осуществлять генетические манипуляции. Тем не менее, существуют некоторые препятствия в развитии целлюлолитической способности *E. coli*. В то время как большинство природных целлюлолитических микробов – экстремофилы, живущие в условиях высоких температур или низких pH, кишечная палочка является мезофилом и, таким образом, целлюлазная система, принятая от экстремофила, не может эффективно функционировать в *E. coli*. Однако, в отличие от экстремофилов, анаэробные мезофилы продуцируют сложные целлюлазы, называемые целлюлосомами [19]. Целлюлосома состоит из нецеллюлолитического каркасного белка, к которому свободные целлюлазы прикрепляются стыковочным доменом и вся конструкция локализуется на поверхности клетки.

В то время как усиление растворимости экспрессируемых целлюлаз является существенной проблемой, секреция растворимых целлюлаз является еще одной важной предпосылкой для СВР. Кишечная палочка обладает толстой наружной мембраной и очень ограниченное количество секреторных систем способно транспортировать белок во внеклеточное пространство (рис. 1). Таким образом, эта толстая внешняя мембрана обеспечивает дополнительное препятствие в построении секреторируемых целлюлолитических систем. Сверхэкспрессия целлюлолитической системы без разработки нового пути секреции белка, вероятно, ингибирует рост клеток за счет обструкции нативных транспортных путей [5].

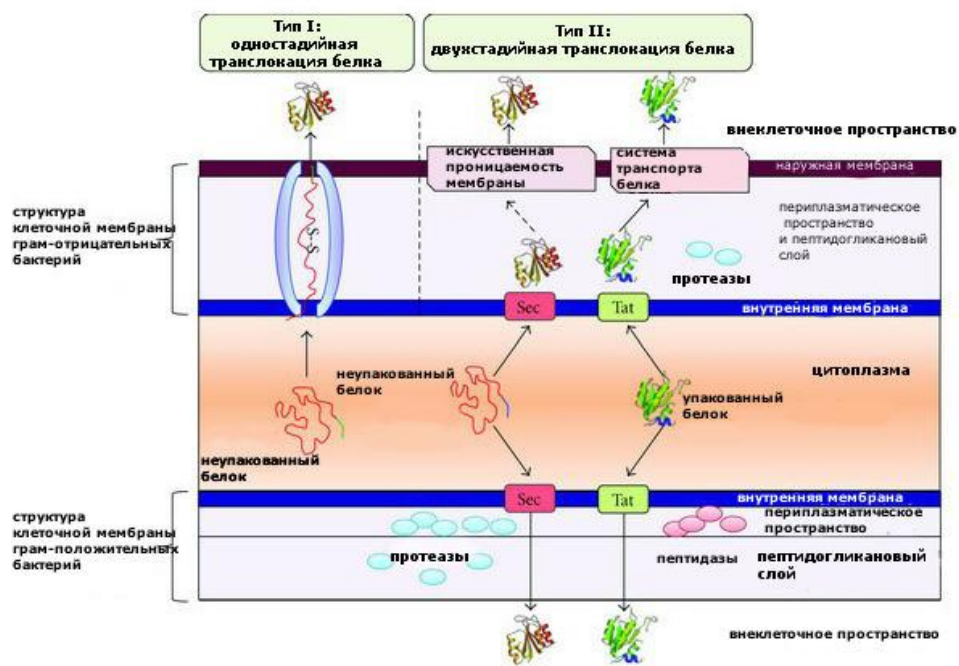


Рис. 1. Особенности и отличия в системах транспорта белков сквозь клеточную мембрану у грамположительных и грамотрицательных бактерий

Кишечная палочка обладает эндогенной целлюлазой, которая может секретироваться в случае сверхсинтеза [20]. Рекombинантная целлюлаза, ориентированная на транспорт в периплазматическое пространство, может секретироваться в среду в *lpp*-делетированном штамме кишечной палочки [21]. Хотя клонирование и секреция нескольких гетерологичных генов возможны в *E. coli*, этого не достаточно для консолидированного биопроцессинга растительной биомассы, в основном, из-за меньшей субстратной специфичности легко экспрессируемых целлюлаз *E. coli*.

Был произведен расширенный поиск новой группы целлюлаз, которая является более специфичной для растительной биомассы и легко экспрессируется в *E. coli*. Тем не менее, отсутствие полного знания о механизме действия целлюлаз ограничивает использование

рационального дизайна целлюлазы с желательными признаками для экспрессии в кишечной палочке. Метагеномные библиотеки считаются мощным инструментом для выделения генов с заданными свойствами. Растущий массив метагеномной информации обещает сформировать лучшую группу целлюлаз для экспрессии в *E. coli*. Семейства целлюлаз GH5 и GH9 легко экспрессируются в кишечной палочке. Метагеномная библиотека помогла определить пригодность семейства целлюлаз GH5 и GH9 для *E. coli* [22].

Несмотря на доступность нескольких регулируемых систем экспрессии генов, экспрессия нескольких генов с образованием продуктов в растворимой форме является технически сложной задачей в *E. coli*. Таким образом, были приложены усилия для выявления целлюлаз с множественными функциями. Было обнаружено, что некоторые гидролитические ферменты проявляют значительный уровень эндоглюканазной, экзоглюканазной и ксиланазной активности. Метагеномный репозиторий был бы очень полезным инструментом для выделения многофункциональной целлюлазы с более высокой активностью в мезофильных условиях.

Кишечная палочка способна использовать все моносахариды, которые можно получить из растительной биомассы [3]. Целлобиоза является димером глюкозы и является основным конечным продуктом гидролиза целлюлозы. Накопленная целлобиоза тормозит эндо- и экзоглюканазы, что приводит к разрыву в общем процессе. Поэтому инженерная модификация системы потребления целлобиозы могла бы стать первым шагом к СВР, потому что она поможет удалить потенциальные ингибирующие соединения (целлобиоза) немедленно после того, как они образуются, тем самым обеспечивая непрерывный процесс гидролиза [23]. Таким образом, эти целлюлозометаболизирующие штаммы могут быть использованы в качестве «платформных» штаммов в развитии целлюлолитических *E. coli*.

Обширные исследования помогли усилить пул штаммов-биокатализаторов *E. coli* с превосходной способностью действовать на целлюлозных субстратах, однако потенциал всех этих инженерных штаммов расти непосредственно на растительной биомассе не мог быть доказан. Это происходит главным образом из-за неудачи получения экспрессии полного набора гидролитических ферментов в пределах одного хозяина. Таким образом, были предложены стратегии кокультивирования, чтобы облегчить метаболическую нагрузку экспрессии несколько гетерологичных генов в пределах одной клетки. Эти стратегии кокультивирования есть многообещающий шаг в сторону успешного развития целлюлолитических *E. coli*. Эксплуатация этих систем для инженерной модификации целлюлолитических *E. coli* могла бы обеспечить точную пространственно-временную модуляцию геновой экспрессии нескольких целлюлаз, основанную на накоплении продуктов. Сочетание вышеупомянутых стратегий может помочь преодолеть узкие места, связанные с разработкой целлюлолитических *E. coli*.

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И СЕКРЕЦИЯ ЦЕЛЛЮЛАЗ В *Z. MOBILIS*

Zymomonas mobilis является уникальным грамтрицательным микроорганизмом, который может усваивать глюкозу анаэробно через Entner-Doudoroff (ED) путь в отличие от других грамтрицательных микроорганизмов (например, кишечная палочка), которые используют путь Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Будучи важным промышленным организмом-хозяином, *Zymomonas mobilis* имеет ряд преимуществ для производства биотоплива, которые включают более высокую степень использования сахара, более низкий выход клеточной биомассы и повышенный выход/толерантность к этанолу. Еще одним преимуществом является то, что контролируемое добавление/удаление кислорода не требуется в процессе ферментации, так как *Z. mobilis* может расти микроаэрофильно. Тем не менее, применение этой бактерии ограничено из-за того, что она может использовать только три сахарных субстрата: глюкозу, фруктозу и сахарозу. Для расширения диапазона субстратов, а особенно для использования полимеров, полученных из растительной биомассы, несколько генов PCDE были клонированы и экспрессированы в *Z. mobilis*.

Гены эндоглюканазы, таких как *adhII* [24], *CMCase* [25, 26], и *celZ* [27] экспрессировались в *Z. mobilis* под контролем либо промотора хлорамфеникол ацилтрансферазы (*cat*) [24], либо их собственных промоторов [27-29].

Для гидролиза биомассы растений желательно, чтобы экспрессировались несколько генов PCDE в *Z. mobilis*. Разработка *Z. mobilis* в качестве жизнеспособного «платформного» организма-хозяина в целях производства целлюлозного биотоплива, требует дополнительных исследований по инженерной модификации *Z. mobilis*, который был бы способен выделять несколько PCDE во внеклеточное пространство для деградации растительной биомассы.

ЭКСПРЕССИЯ ФЕРМЕНТОВ, РАЗРУШАЮЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СТЕНКИ В РАСТЕНИЯХ

Экспрессия PCDE *in planta* имеет несколько преимуществ по сравнению с другими системами экспрессии (например, кишечная палочка, грибы и дрожжи), в плане экономически эффективного производства целлюлозного биотоплива. Так как растения могут являться и организмом-хозяином, и субстратом целлюлозной биомассы для ферментации сахара, экспрессия PCDE в растениях могла бы привести к самодеструкции растительных клеточных стенок для получения мономерных сахаров. Комбинация этого подхода с синтетическими целлюлолитическими микробами могла бы значительно повысить экономическую эффективность целлюлозного биотопливного процесса (рис. 2). Это объяснялось бы тем, что высокий уровень синтеза нескольких PCDE в природных целлюлолитических и промышленных микробах возлагает на них огромную метаболическую нагрузку, что приводит к снижению производства биотоплива, в то время как подход *in planta* будет способствовать самогидролизуемому субстрату, позволяя снизить «метаболическую цену» экспрессии нескольких PCDE в целлюлолитических микробах. Таким образом, гидролиз растительных клеток *in planta* предлагает большие возможности для упрощения процесса производства ферментов/биомассы и гидролиза, а также минимизирует общую стоимость производства фермента, не требуя использования дорогостоящих биореакторов или сложных процессов очистки.

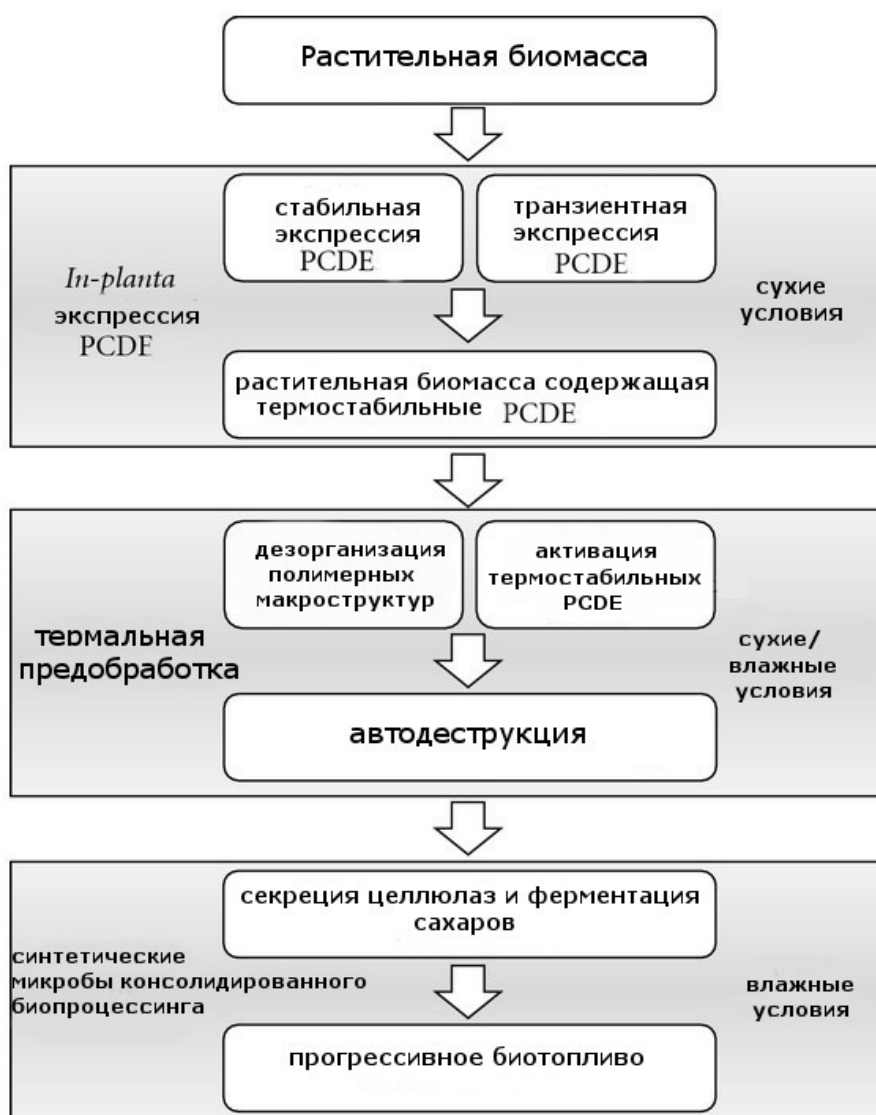


Рис. 2. Комбинация экспрессии PCDE *in planta* и синтетических микроорганизмов консолидированного биопроцессинга может обеспечить эффективное производство биотоплива целлюлозного происхождения

Кроме того, растения также способны к посттрансляционным модификациям, которые могут быть необходимы для правильной упаковки белков и, таким образом, функциональности специфических ферментов [30]. По этим причинам, экспрессия PCDE в растениях приобретает все

большую популярность. Например, автогидролиза клеток растений можно избежать путем введения термостабильных целлюлаз, которые проявляют незначительную ферментативную активность при комнатной температуре.

Гетерологичные гены могут стабильно экспрессироваться в трансгенных растениях или временно – в диких растениях. Большинство ранних исследований были сосредоточены на получении стабильных трансформантов, где чужеродные гены были включены в хромосомы растений или хлоропластный геном. После того, как трансгенные линии растений будут разработаны, требуются минимальные усилия, необходимые для производства ферментов, так как синтезируемые ферменты накапливаются в органах растений, таких как листья или стебли во время роста растения.

И напротив, PCDE могут синтезироваться временно в растениях, полученных с помощью *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной транзиторной экспрессии. По сравнению со стабильной трансформацией, использование интактных растений дикого типа в качестве хоста для транзиторной экспрессии выгодно, так как это сводит к минимуму воздействие на окружающую среду генетически модифицированных (ГМ) культур. Кроме того, растения, обработанные *A. tumefaciens*, могут производить ферменты в течение нескольких дней [31].

Для экспрессии PCDE необходим тщательный отбор акцепторных растений, генов-мишеней, и экспрессионных векторов не только для получения высокого уровня экспрессии генов, но для снижения стоимости производства ферментов, а также для содействия предварительной обработке и гидролизу биомассы. Наряду с несколькими различными обычными двудольными растениями, такими, как табак [32] и *Arabidopsis* [33], несколько однодольных растений, таких как сахарный тростник [34], кукуруза [35], рис [36] и яска [37], были использованы для экспрессии целлюлозногидролазы СВН1/СВН2 [38, 39], эндоглюканазы, экзоглюканазы, β -глюкозидазы [32, 38], ксиланазы [33, 38], β -маннаназы [39], пектат-лиаз, и кутиназы [38]. Учитывая продуктивность растительных культур в фунтах на акр, некоторые популярные биотопливные однодольные, такие как *Miscanthus* и просо, могут быть перспективными хозяевами для экспрессии целлюлаз *in planta*. Тем не менее, на сегодняшний день нет опубликованных данных об экспрессии целлюлаз в «топливных» однодольных *in planta*.

Для конструирования векторов экспрессии обычно используется 35S-промотор *CaMV* (вируса мозаики цветной капусты). Однако были сообщения об использовании усиленного 35S-промотора в комбинации с 5' нетранслируемым лидером вируса «гравировки» табака [40] и *perC* промотора кукурузы [34]. В качестве альтернативы ядерной интеграции генов гиперэкспрессия была достигнута, когда кассета экспрессии была интегрирована в геном хлоропластов [41].

Для повышения уровня накопления белка или сохранения высокой активности фермента, общепринятым подходом может быть внутриклеточная локализация белка путем включения транзитного пептида в генную конструкцию. Kim и др. проверили три различных источника транзитных пептидов хлоропластного таргетинга, таких как светособирающего хлорофилл *a/b*-связывающий белок, малой субъединицы Rubisco (RS), и Rubisco активазы. Они обнаружили, что сигнальный пептид RS способствует самому высокому уровню накопления целлюлазы, Cel5A, в растениях трансгенного табака [32]. Jiang и соавт. осуществили прямое сравнение трех различных субклеточных локализаций эндоглюканазы, E2. Они достигли наивысшей активности фермента, когда E2 была направлена на апопласт с помощью CLASP (сигнального пептида калретикулина табака) и самой низкой активности фермента в цитозольной E2 [40].

Интересно, что экспрессия PCDE может придавать полезные черты в трансгенных растениях. Например, экспрессия пектатлиазы в растениях табака улучшает устойчивость к патогенным бактериям *E. carotovora*, вероятно, через индукцию защитного иммунного ответа у растений [38].

Что касается свойств гетерологичных ферментов, то, так как растения могут осуществлять посттрансляционную модификацию, очевидно, молекулярная масса ферментов может быть увеличена, вероятно, из-за гликозилирования и других посттрансляционных модификаций [34]. Если PCDE имеет несколько таких доменов, как углевод-связывающий домен (CBD), линкерный пептид и каталитический домен, линкерный пептид может быть отщеплен от холофермента в зависимости от типа фермента, растения-хозяина, и способа экспрессии. Harrison и соавт. сообщили о снижении молекулярного веса экспрессированного СВН-I и СВН-II в трансгенном сахарном тростнике, а с другой стороны, бактериальная EG, которая имеет один домен без CBD, показала ожидаемую молекулярную массу [34]. Интересно, что PCDE, продуцируемые растениями, как правило, показывают стабильность при более высоких значениях температуры и pH, чем синтезируемые *E. coli*. Agrawal и соавт. напрямую сравнивали стабильность ферментов из *E. coli* и полученных из растительных хлоропластов PelB, PelD, CelD и β -маннаназы при различных значениях pH и температуры. Они установили, что ферменты, полученные из хлоропластов, показали лучшую стабильность, чем ферменты, полученные из кишечной палочки [41]. Таким образом, комбинация растительной экспрессии и синтетических СВР может оказать хороший синергетический эффект на производство биотоплива (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для эффективного производства биотоплива, экспрессия ферментов, разрушающих клеточную стенку в организме хозяина, должна быть увязана с биопроцессингом целлюлозной биомассы. Хотя на сегодняшний день доступны различные стратегии, зависящие от уникальных особенностей каждого организма-хозяина или экспрессионной системы, все они направлены на достижение одной цели – высокого уровня синтеза нескольких ферментов целлюлаз и одновременного гидролиза и ферментации целлюлозной биомассы. В настоящий момент будущее этих конкурирующих технологий трудно предсказать; более того, трудно определить наиболее эффективный организм-хозяин среди кишечной палочки, *Z. mobilis*, грибов и растений. Тем не менее, очевидно, что технология выбора будет создана через интеграцию многочисленных существующих и будущих технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee S.K., Chou H., Ham T.S., Lee T.S., and Keasling J.D. *Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels* // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2008. – Vol.19, №6. – P. 556–563.
2. Sakuragi H., Kuroda K., Ueda M. *Molecular breeding of advanced microorganisms for biofuel production* // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 2011. – 11 p.
3. Park J.M., Vinuselvi P., Kim T., Lee S.K. *The mechanism of sugar-mediated catabolite repression of the propionate catabolic genes in Escherichia coli* / *Gene*. – 2012. – Vol. 504, №1. – P. 116–121.
4. Steen E.J., Kang Y., Bokinsky G. et al. *Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass* // *Nature*. – 2010. – Vol. 463, №7280. – P. 559–562.
5. Mazzoli R., Lamberti C., Pessione E. *Engineering new metabolic capabilities in bacteria: lessons from recombinant cellulolytic strategies* // *Trends in Biotechnology*. – 2012. – Vol. 30, №2. – P. 111–119.
6. Xu Q., Singh A., Himmel M.E. *Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose* // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2009. – Vol. 20, №3. – P. 364–371.
7. Dashtban M. et al. *Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives* // *International Journal of Biological Sciences*. – 2009. – Vol. 5. – P. 578–595.
8. Rincon M.T. et al. *Abundance and diversity of dockerin-containing proteins in the fiber-degrading rumen bacterium Ruminococcus flavefaciens FD-1* // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5.
9. Maamar H. et al. *Transcriptional analysis of the cip-cel gene cluster from Clostridium cellulolyticum* // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – Vol. 188. – P. 2614–2624.
10. Newcomb M. et al. *Co-transcription of the celC gene cluster in Clostridium thermocellum* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 90. – P. 625–634.
11. Nataf Y. et al. *Clostridium thermocellum cellulosomal genes are regulated by extracytoplasmic polysaccharides via alternative sigma factors* // *Proceedings of National Academy of the Sciences of the U.S.A.* – 2010. – Vol. 107. – P. 18646–18651.
12. Mingardon F. et al. *The issue of secretion in heterologous expression of Clostridium cellulolyticum cellulase-encoding genes in Clostridium acetobutylicum ATCC 824* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – Vol. 77. – P. 2831–2838.
13. Wiczorek A.S., Martin V.J. *Engineering the cell surface display of cohesins for assembly of cellulosome-inspired enzyme complexes on Lactococcus lactis* // *Microbial Cell Factories*. – 2010. – Vol. 9. – P. 69.
14. Yeh C.M. et al. *Extracellular expression of a functional recombinant Ganoderma lucidum immunomodulatory protein by Bacillus subtilis and Lactococcus lactis* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 74. – P. 1039–1049.
15. Talarico L.A. et al. *Construction and expression of an ethanol production operon in Gram-positive bacteria* // *Microbiology*. – 2005. – Vol. 151. – P. 4023–4031.
16. Talarico L.A. et al. *Production of the Gram-positive Sarcina ventriculi pyruvate decarboxylase in Escherichia coli* // *Microbiology*. – 2001. – Vol.147. – P. 2425–2435.
17. Raj K.C. et al. *Cloning and characterization of the Zymobacter palmae pyruvate decarboxylase (pdc): comparison to bacterial homologues* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 68. – P. 2869–2876.
18. Linger J.G. et al. *Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by Zymomonas mobilis* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – Vol. 76. – P. 6360–6369.
19. Doi R.H., Kosugi A. *Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes* // *Nature Reviews Microbiology*. – 2004. – Vol. 2, №7. – P. 541–551.

20. Park Y.W. and Yun H.D. Cloning of the *Escherichia coli* endo-1,4-D-glucanase gene and identification of its product // *Molecular and General Genetics*. – 1999. – Vol. 261, №2. – P. 236–241.
21. Shin H.D., Chen R.R. Extracellular recombinant protein production from an *Escherichia coli* lpp deletion mutant // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2008. – Vol. 101, №6. – P. 1288–1296.
22. Duan C.J., Feng J.X. Mining metagenomes for novel cellulase genes // *Biotechnology Letters*. – 2010. – Vol. 32, №12. – P. 1765–1775.
23. Vinuselvi P., Lee S.K. Engineering *Escherichia coli* for efficient cellobiose utilization // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 92, №1. – P. 125–132.
24. Piriya P.S. et al. Cellulosic Ethanol Production by Recombinant Cellulolytic Bacteria Harboring *pdg* and *adh II* Genes of *Zymomonas mobilis* // *Biotechnology Research International*. – 2012. – Vol. 2012. – 8 p.
25. Angov E. et al. Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding // *Methods in Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 705. – P. 1–13.
26. Wilson D.B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 1125. – P. 289–297.
27. Zhou S. et al. Enhancement of expression and apparent secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase (encoded by *celZ*) in *Escherichia coli* B // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – Vol. 65, №6. – P. 2439–2445.
28. Okamoto T., Yamano S., Ikeaga H., Nakamura K. Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1994. – Vol. 42, №4. – P. 563–568.
29. Yanase H., Kato N., Tonomura K. Strain improvement of *Zymomonas mobilis* for ethanol production // *Bioprocess technology*. – 1994. – Vol. 19. – P. 723–739.
30. Gomord V. et al. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production // *Plant Biotechnology Journal*. – 2010. – Vol. 8, №5. – P. 564–587.
31. Ma L., Lucasik E., Gawehns F., Takken F.L. The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves // *Methods in Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 835. – P. 61–74.
32. Kim S., Lee D.S., Choi I.S., Ahn S.J., Kim Y.H., Bae H.J. *Arabidopsis thaliana* Rubisco small subunit transit peptide increases the accumulation of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel5A in chloroplasts of transgenic tobacco plants // *Transgenic Research*. – 2010. – Vol. 19, №3. – P. 489–497.
33. Borkhardt B., Harholt J., Ulvskov P., Ahring B. K., Jørgensen B., Brinch-Pedersen H. Autohydrolysis of plant xylans by apoplastic expression of thermophilic bacterial endo-xylanases // *Plant Biotechnology Journal*. – 2010. – Vol. 8, №3. – P. 363–374.
34. Harrison M.D., Geijskes J., Coleman H.D. et al. Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane // *Plant Biotechnology Journal*. – 2011. – Vol. 9, №8. – P. 884–896.
35. Hood E.E., Love R., Lane J. et al. Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulase protein in transgenic maize seed // *Plant Biotechnology Journal*. – 2007. – Vol. 5, №6. – P. 709–719.
36. Oraby H., Venkatesh B., Dale B. et al. Enhanced conversion of plant biomass into glucose using transgenic rice-produced endoglucanase for cellulosic ethanol // *Transgenic Research*. – 2007. – Vol. 16, №6. – P. 739–749.
37. Sun Y., Cheng J.J., Himmel M.E. et al. Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627 // *Bioresource Technology*. – 2007. – Vol. 98, №15. – P. 2866–2872.
38. Verma D., Kanagaraj A., Jin S., Singh N.D., Kolattukudy P.E., Daniell H. Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars // *Plant Biotechnology Journal*. – 2010. – Vol. 8, №3. – P. 332–350.
39. Alper H., Stephanopoulos G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? // *Nature Reviews Microbiology*. – 2009. – Vol. 7, №10. – P. 715–723.
40. Jiang X., Zhou X., Jiang W., Gao X., Li W. Expressions of thermostable bacterial cellulases in tobacco plant // *Biotechnology Letters*. – 2011. – Vol. 33, №9. – P. 1797–1803.
41. Agrawal P., Verma D., Daniell H. Expression of *Trichoderma reesei* β -mannanase in tobacco chloroplasts and its utilization in lignocellulosic woody biomass hydrolysis // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, №12.

ТҮЙІН

Биокалдықтардың целлюлозасы ферментация жолымен алынатын жоғарысапалы өнімдер (мысалы, отын немесе пластмасса) өндірісі үшін ең тиімді субстрат. Дегенмен, дәстүрлі қайта

өңделген биомассалар экономикалық эффективті емес көпсатылы процесс болып табылады. Қазіргі уақытқа дейін бірсатылы ферментация орындайтын қабілетке ие микроорганизмдер жоқ (жасақталған биопроцессинг; СВР). Биомассадан сахароза өндірісі үшін қажетті өсімдік клеткасының (PCDE) қабырғасын бұзатын ферментке кететін шығын көлемін азайту целлюлозды биоотын өндірісінде экономикалық эффективтіліктің ең негізгі техникалық проблемасы болып табылады. Ішек таяқшасы сияқты әртүрлі қожайын-организмдерде, *Zymomonas mobilis*-те және кейбір өсімдіктерде PCDE өндірісі үшін көптеген бәсеге қабілетті технологиялар жасалған. Тиімді жасақталған биопроцессинг және PCDE-тің гетерологиялық экспрессиясы рекомбинантты *E. coli*-да немесе *Z. mobilis*-те жүруі мүмкін. *In planta* экспрессиясы өсімдіктің клетка қабырғасымен өздігінен деструкция жүргізуге және өсімдік биомассасын қайта өңдеуге және фермент өндірудегі процестерді жеңілдетуге мүмкіндік береді. Қазіргі уақытта технологиясын, оның толық жүзеге асуын айту қиын, дегенмен жаңа технологияның дамуы негізінде белгілі әдістерді біріктіру арқасында болашақта орындалуы ықтимал.

Кілтті сөздер: целлюлазалар, гетерологиялық экспрессия, жасақталған биопроцессинг, биоотын.

SUMMARY

Cellulose from biowaste is the most attractive substrate for the production of high quality products (e.g., fuel or plastics) by fermentation. However, the traditional processing of biomass is economically inefficient multi-step process. So far, no microorganisms able to perform single-stage fermentation (consolidated bioprocessing; CBP). The main technical problem in a cost-effective production of cellulosic biofuel is a need to reduce the cost of plant cell walls degrading enzymes (PCDE), which are necessary for the production of sugars from biomass. Several competitive low-cost technologies were developed for the production of PCDE in various host organisms such as *E. coli*, *Zymomonas mobilis* and some plants. There is possible heterologous expression in recombinant *E. coli* PCDE or *Z. mobilis* and successful consolidated bioprocessing in these microorganisms. *In planta* expression enables to simplify the enzyme production process and biomass processing leading to self-destruction of the plants cell walls. Although the future of the currently available technologies is difficult to predict their full implementation is likely through the integration of existing approaches to the development of breakthrough technologies.

Keywords: cellulases, heterologous expression, consolidated bioprocessing, biofuel.