Оптимизация продукции биоэтанола дрожжами вида *Saccharomyces cerevisiae*

Котенко Анастасия Викторовна
Кафедра Информационной биологии
ФЕН НГУ, гр.10412

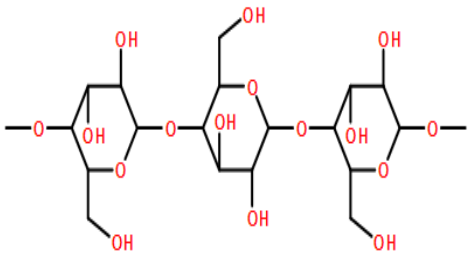
Научный руководители: к.б.н. Пельтек Сергей Евгеньевич,
к.б.н. Акбердин Илья Ринатович

Новосибирск - 2015

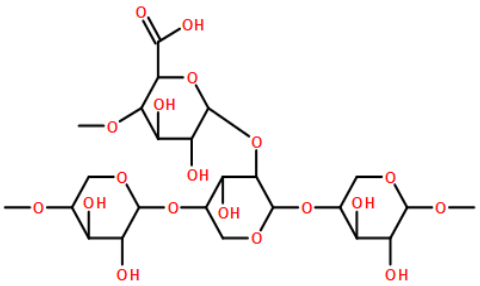
СОСТАВ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ

Лигноцеллюлоза

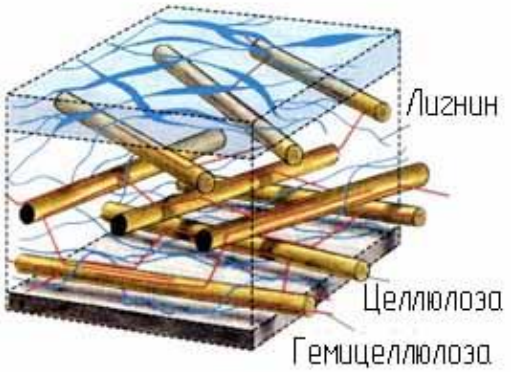
Целлюлоза



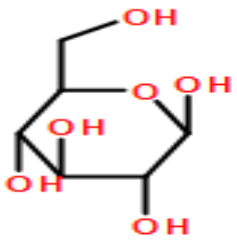
Гемицеллюлоза



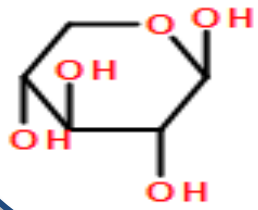
Лигнин



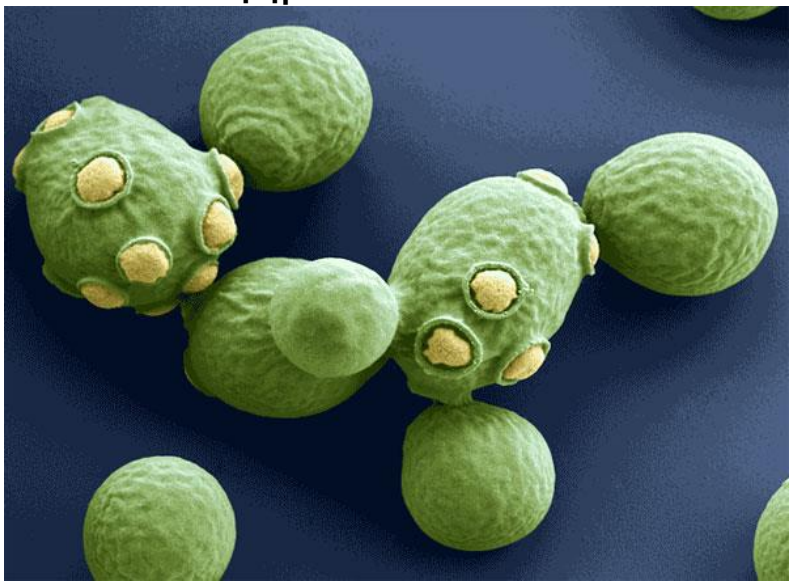
Глюкоза



Ксилоза



Дрожжи *S. cerevisiae*



http://elementy.ru/news/431430

ОБЩАЯ СХЕМА РАЗРАБОТКИ ПРОДУЦЕНТА

Цель работы:

Разработка основ для создания продуцента биоэтанола, способного к утилизации пентасахаров, на основе дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae,* с использованием экспериментального и теоретического подходов.

Задачи:

1. Разработка генно-инженерной конструкции, необходимой для введения гена фермента ксилозоизомеразы в геном *S. cerevisiae;*

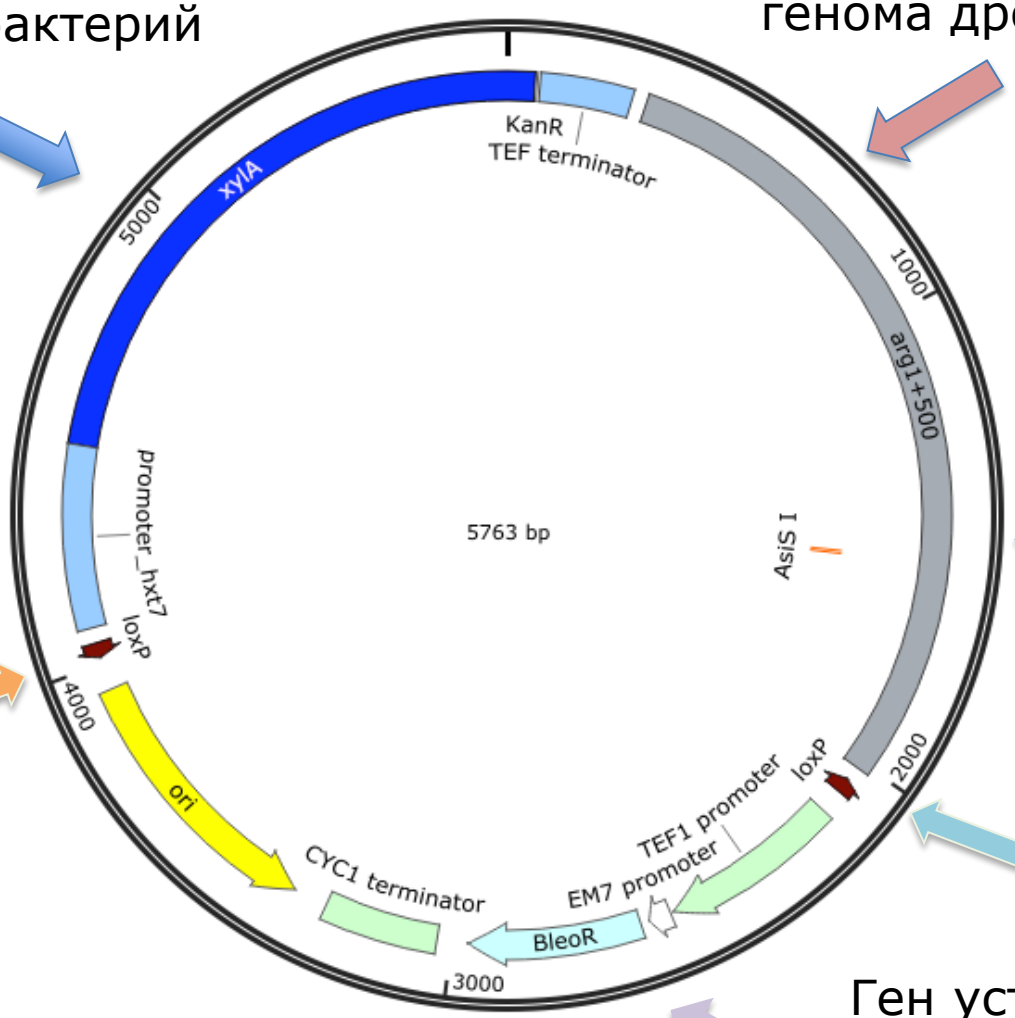
2. Расширение математической модели метаболизма глюкозы и пентозофосфатного пути дрожжей *S. cerevisiae* путем добавления уравнений реакций ферментативного пути утилизации ксилозы;

3. Поиск мишеней среди ферментов метаболизма глюкозы и ксилозы *in silico* для оптимизации продукции этанола.

КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ

Ген *xylA* из бактерий *L. brevis*

Последовательность из генома дрожжей



Промотор *hxt7*

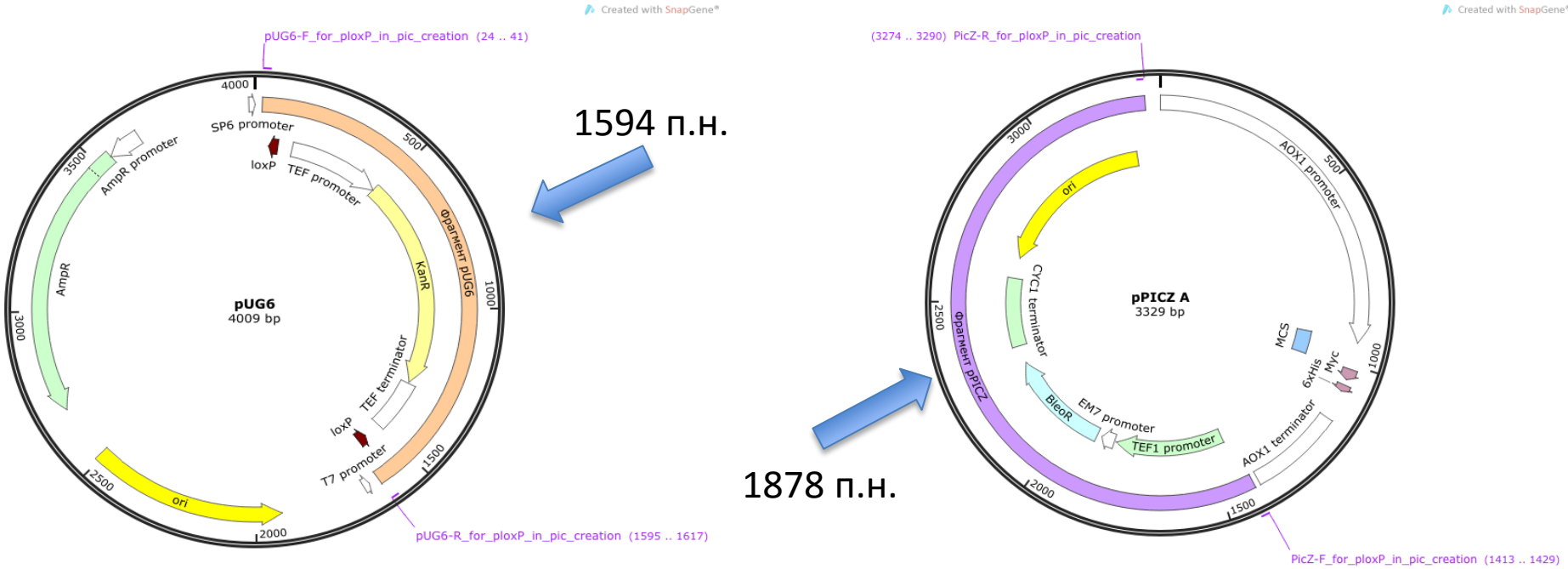
Сайт рестрикции

loxP сайт

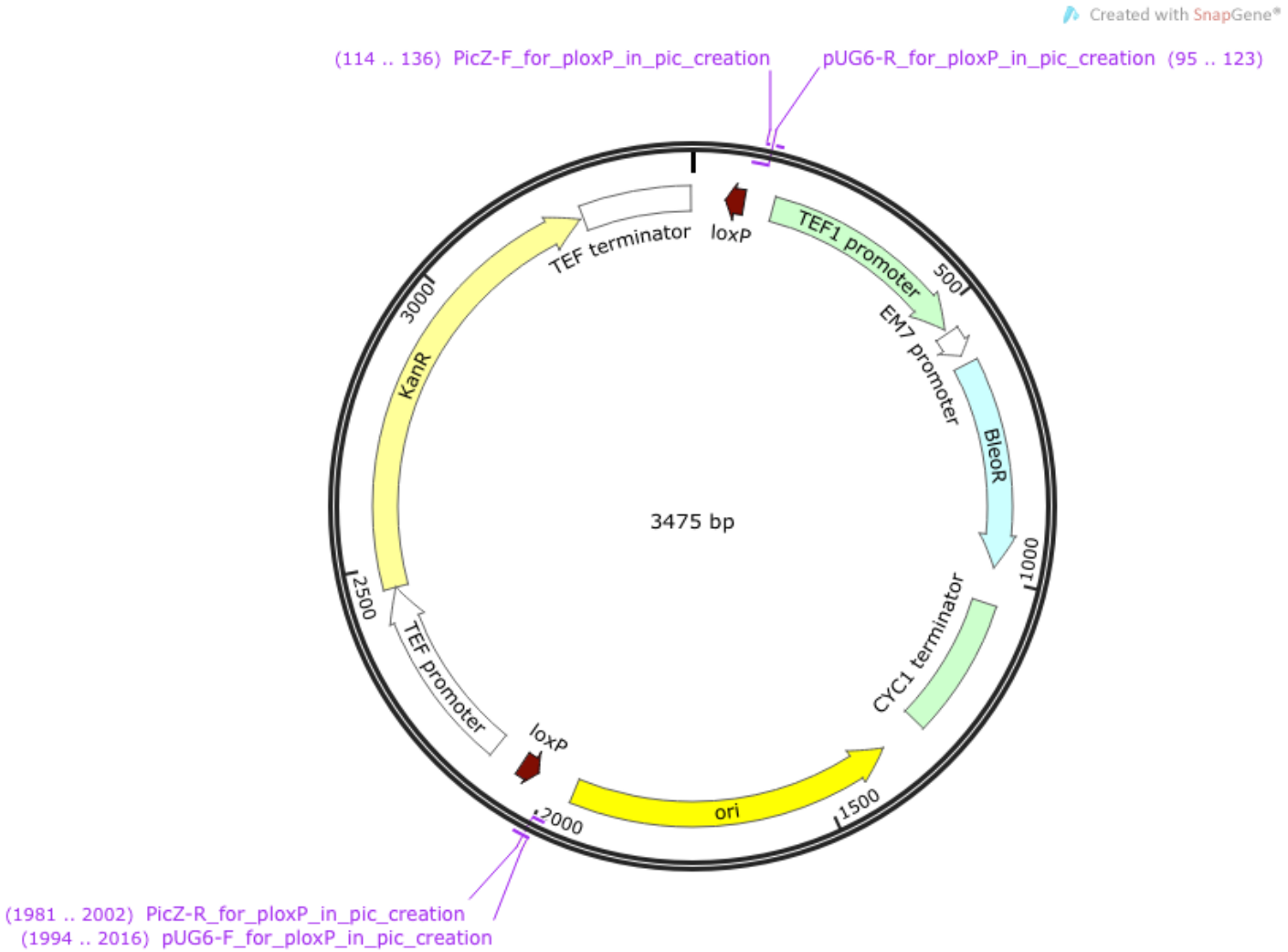
loxP сайт

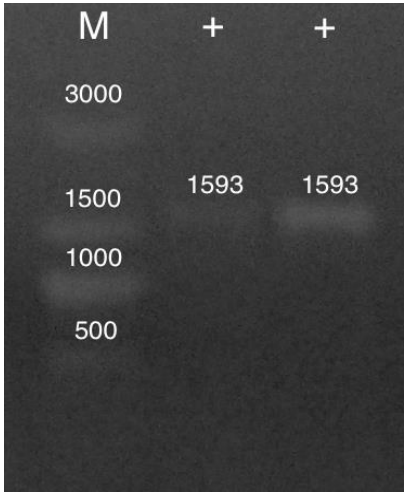
Ген устойчивости к зеоцину

СБОРКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ (1)



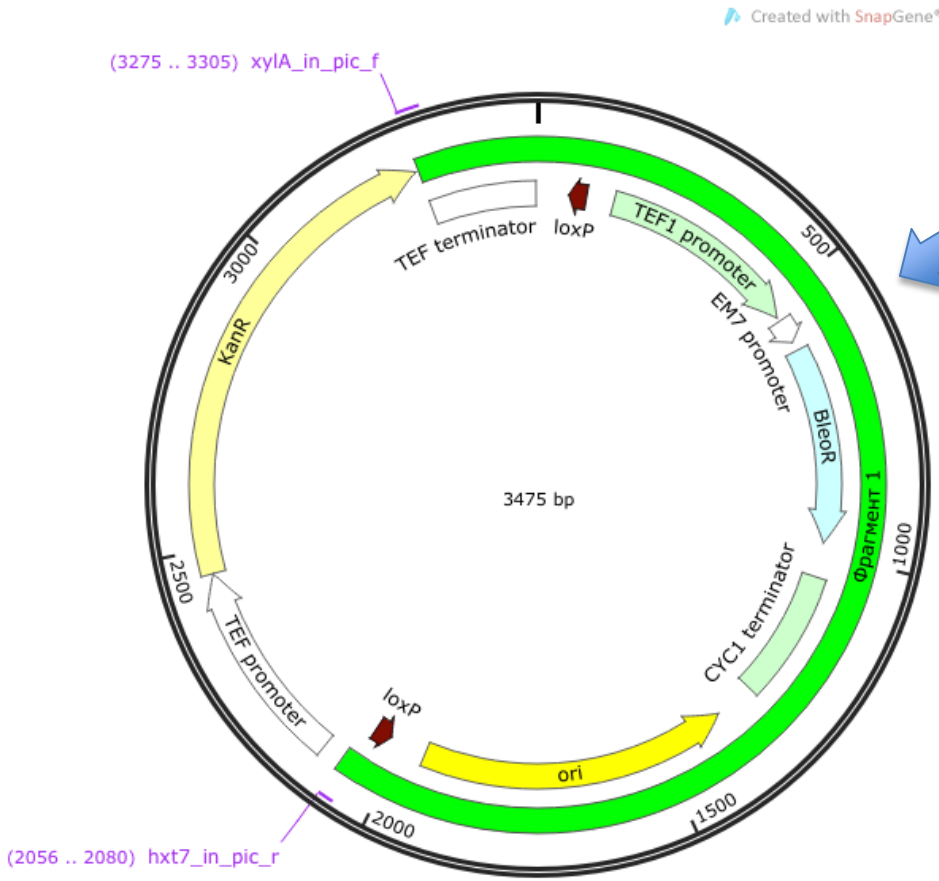
СБОРКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ (1)





Электрофореграмма продуктов ПЦР. «М» – маркер, «+» - образцы, давшие положительный результат.

СБОРКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ (2)

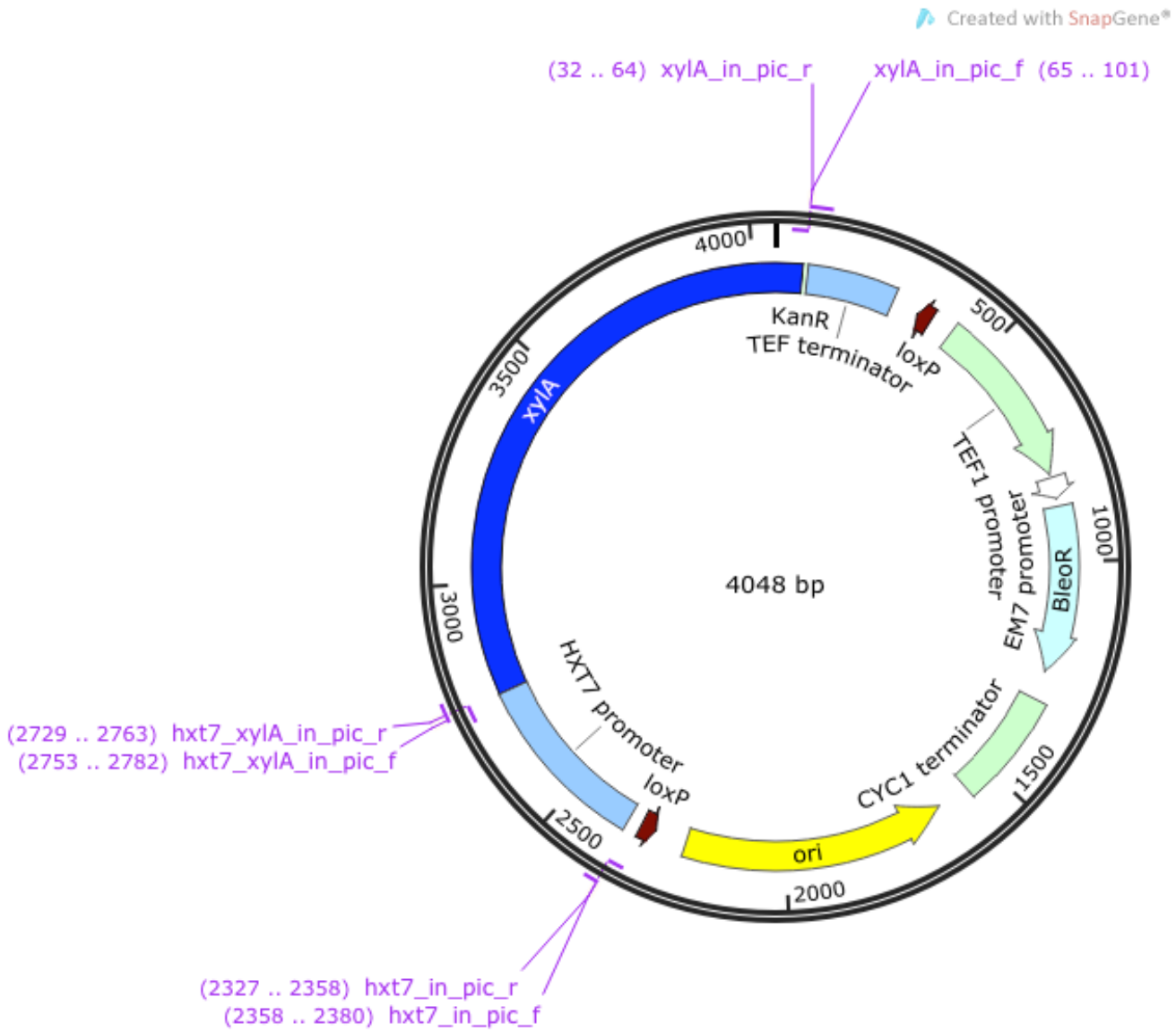


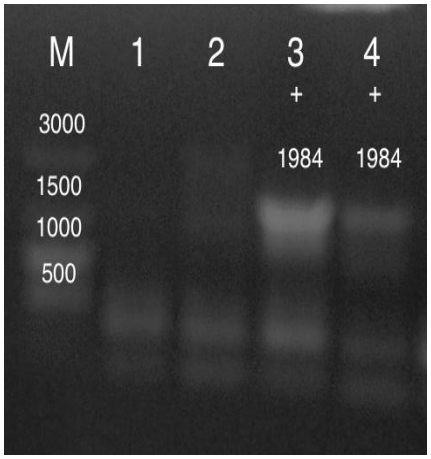
2281 п.н.

\+ *xylA* (1350 п.н.)

\+ промотор *hxt7* (393 п.н.)

СБОРКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ (2)

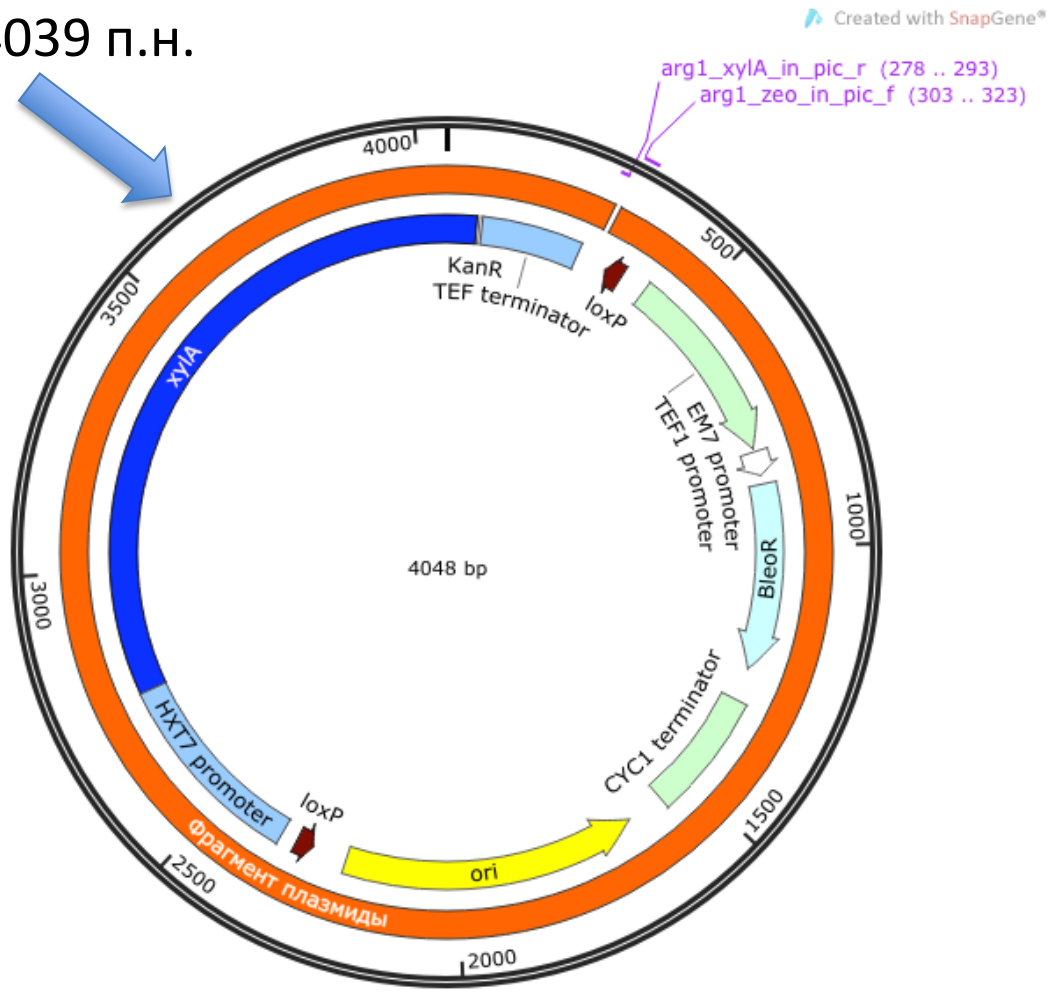




Электрофореграмма продуктов ПЦР. «М» – маркер, «+» - образцы, давшие положительный результат.

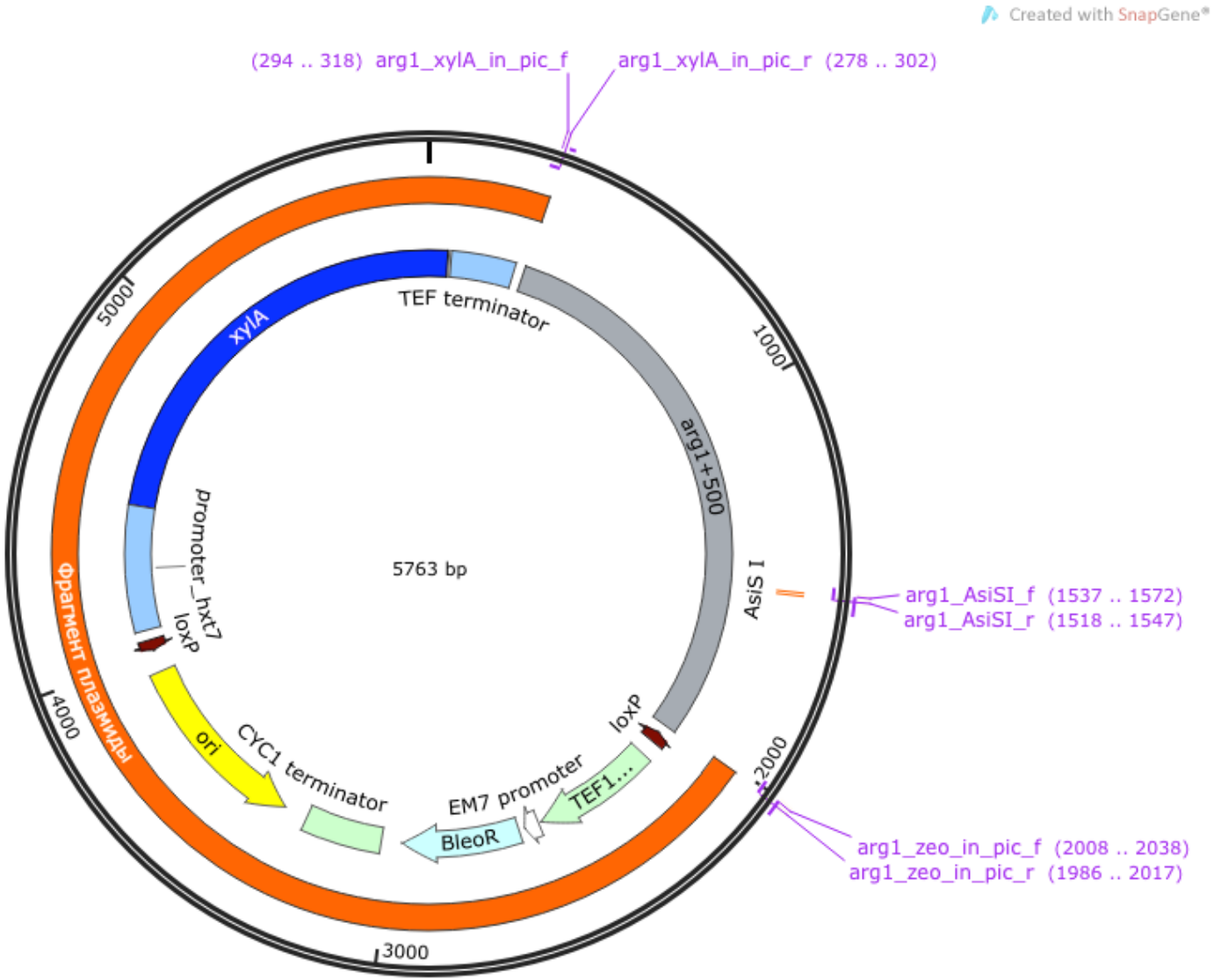
СБОРКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ (3)

4039 п.н.

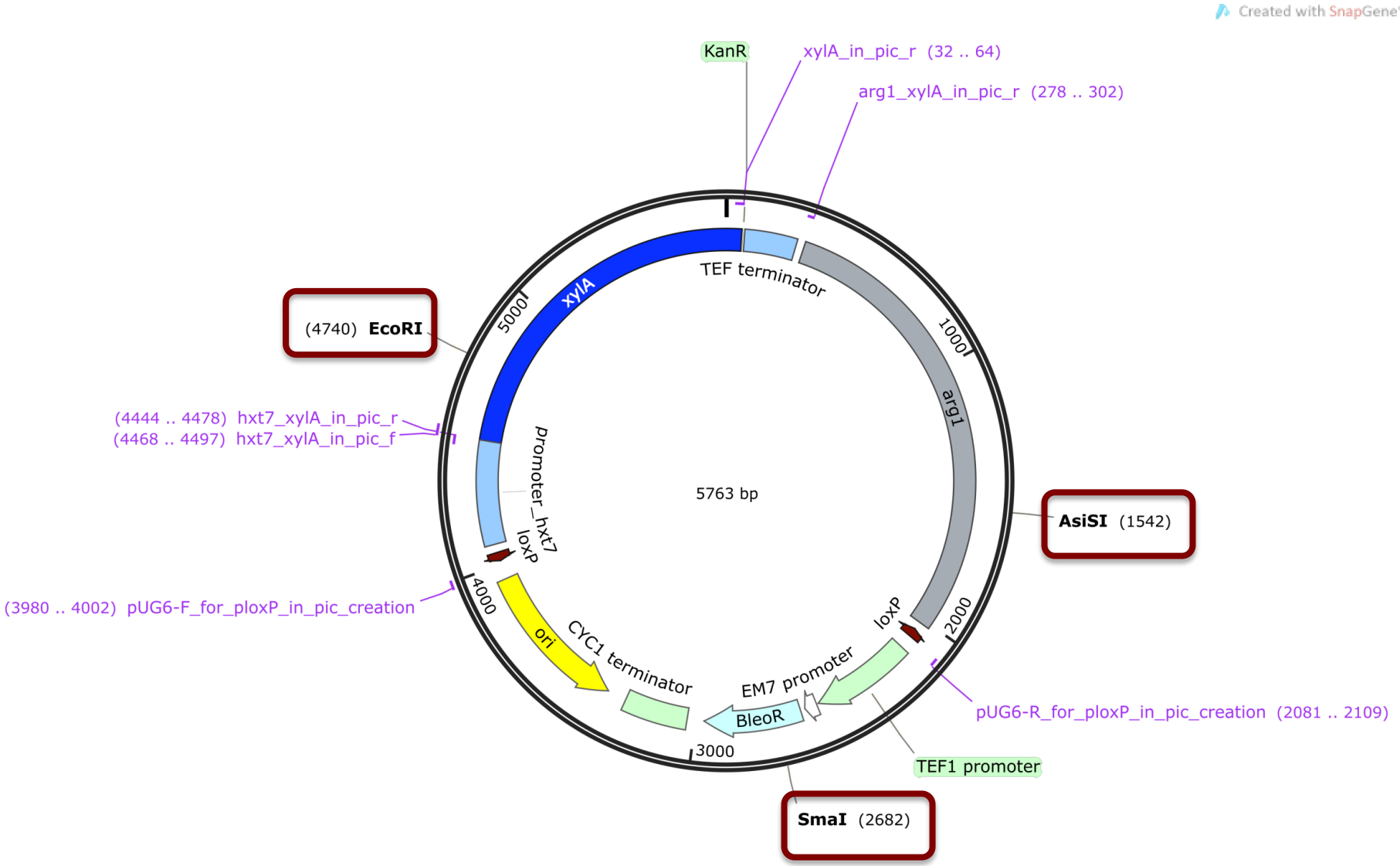


+ последовательность из генома дрожжей (1254 п.н. + 481 п.н.)

СБОРКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ (3)

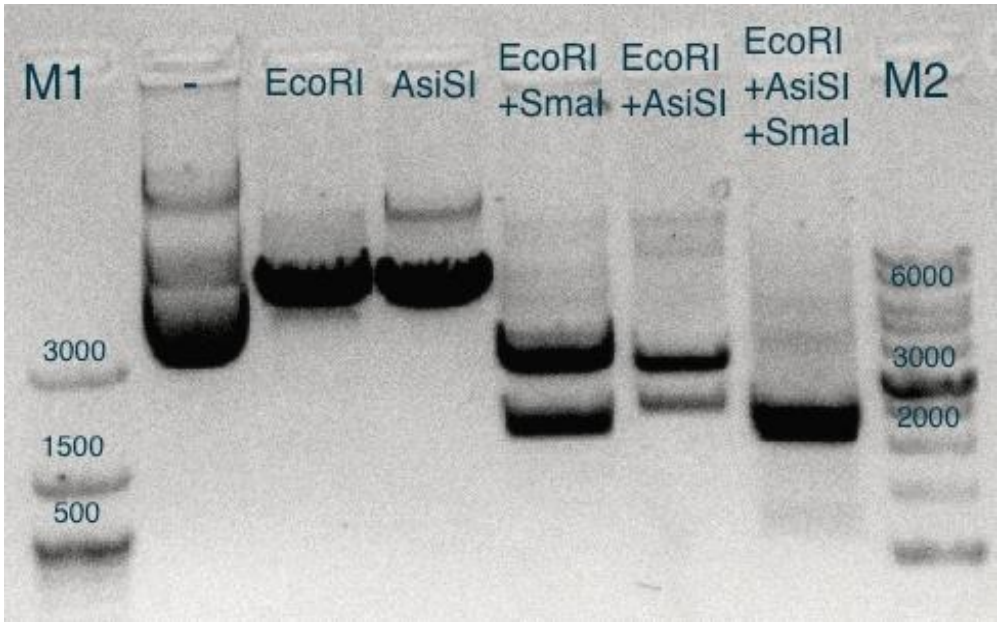


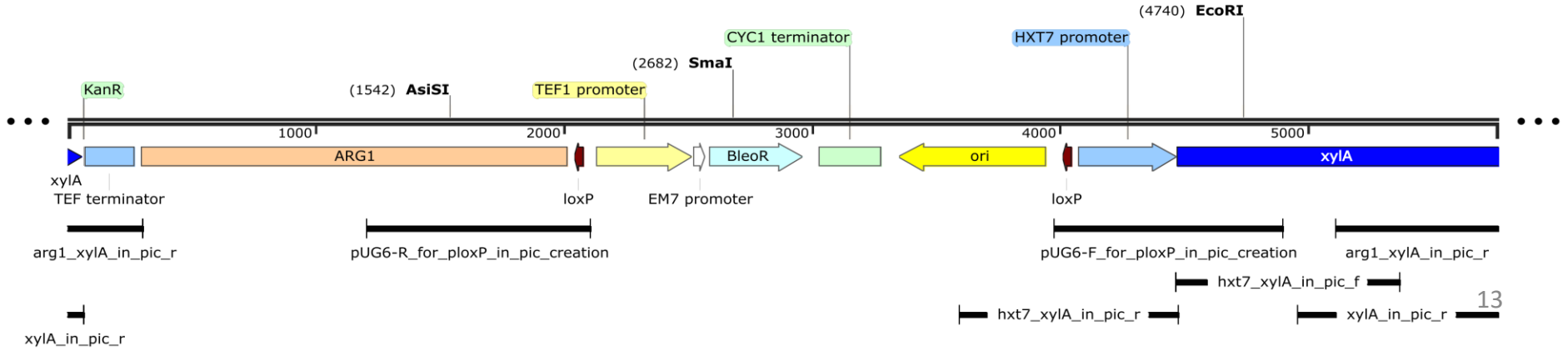
РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК



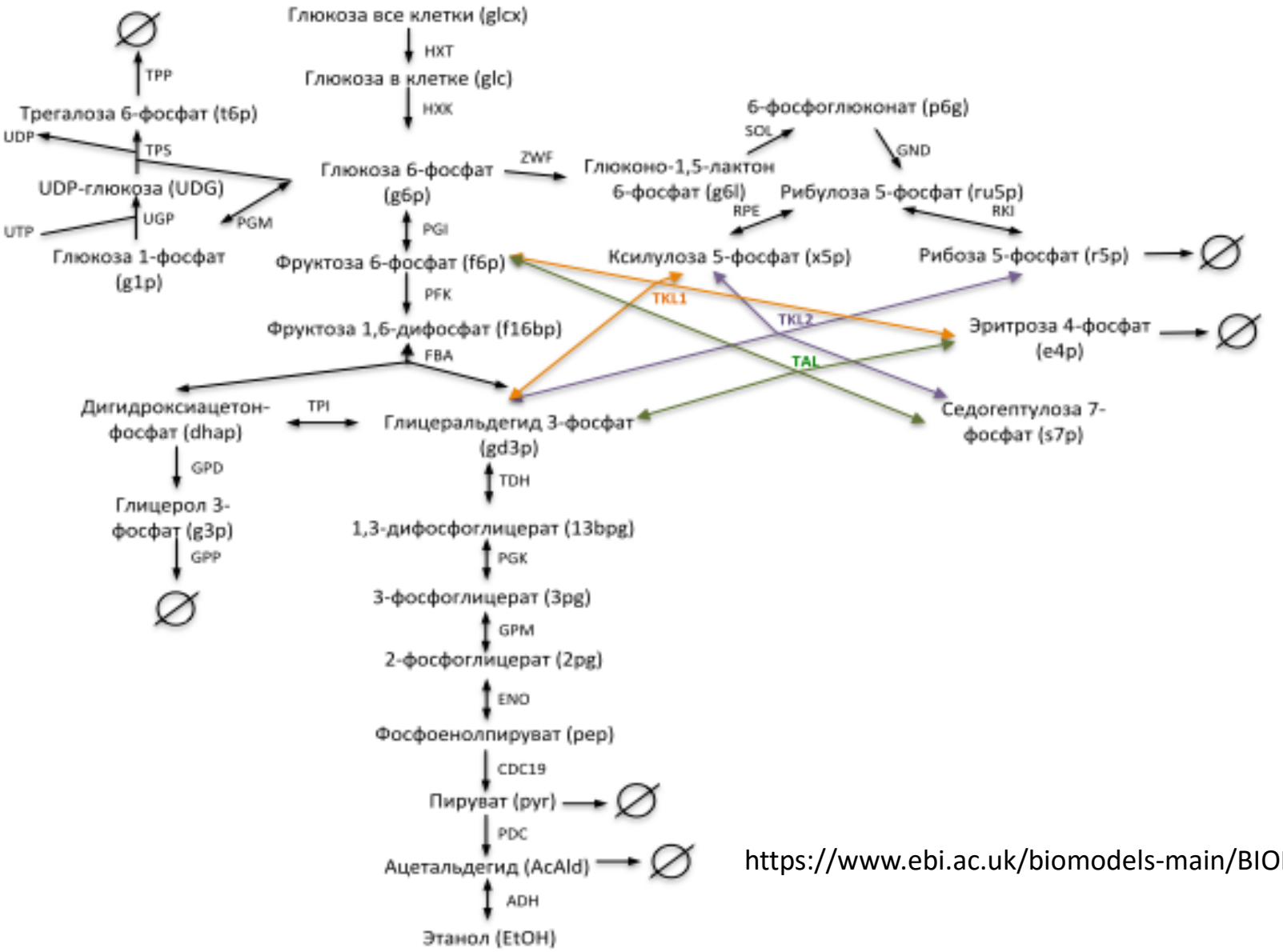
РЕЗУЛЬТАТЫ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА И СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Используемые эндонуклеазы рестрикции	Длина полученных фрагментов, п.н.
EcoRI	5763
AsiSI	5763
EcoRI+SmaI	2058+3705
EcoRI+AsiSI	2565+3298
EcoRI+SmaI+AsiSI	1140+2565+2058



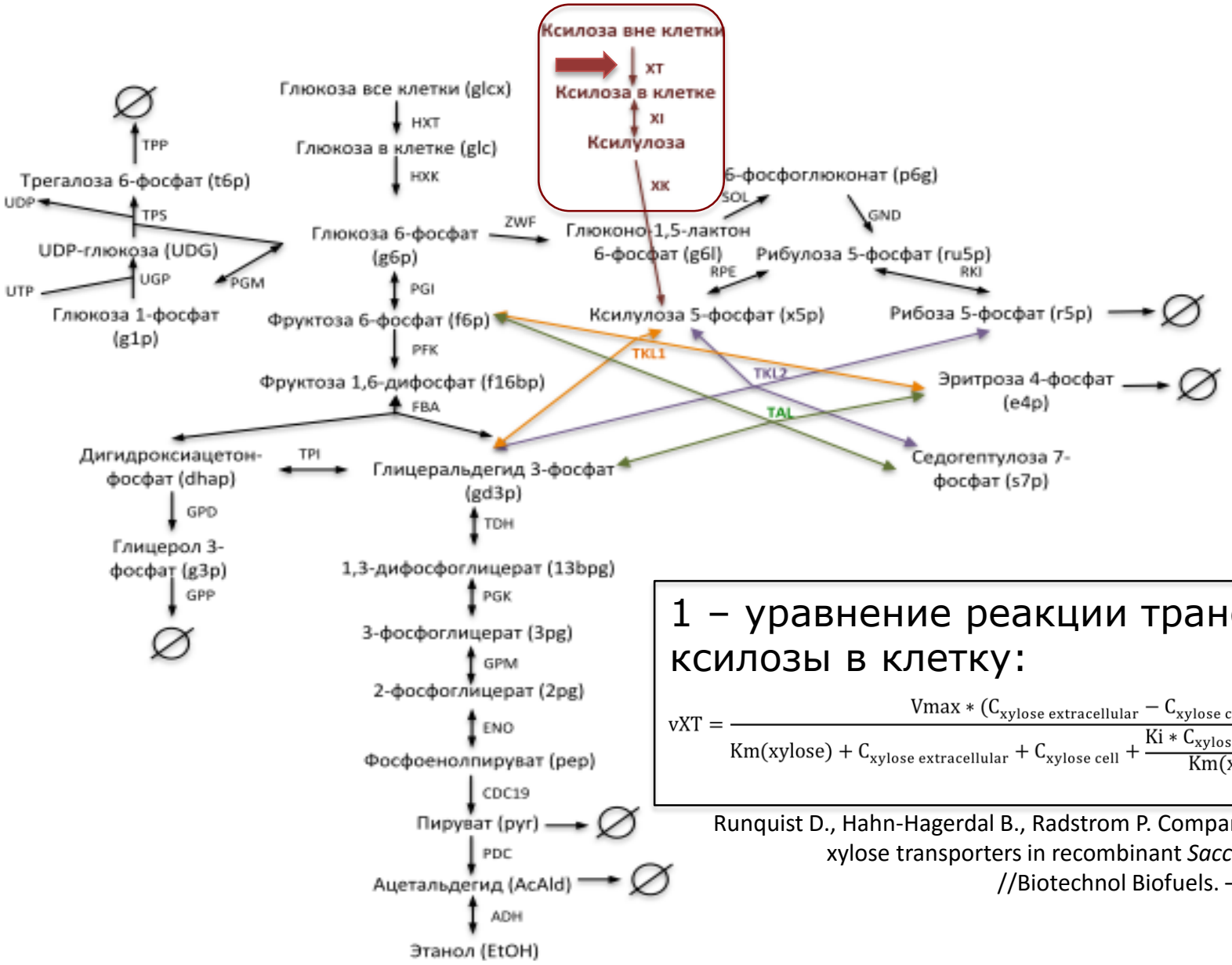


МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ



https://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/BIOMD0000000503

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ И КСИЛОЗЫ

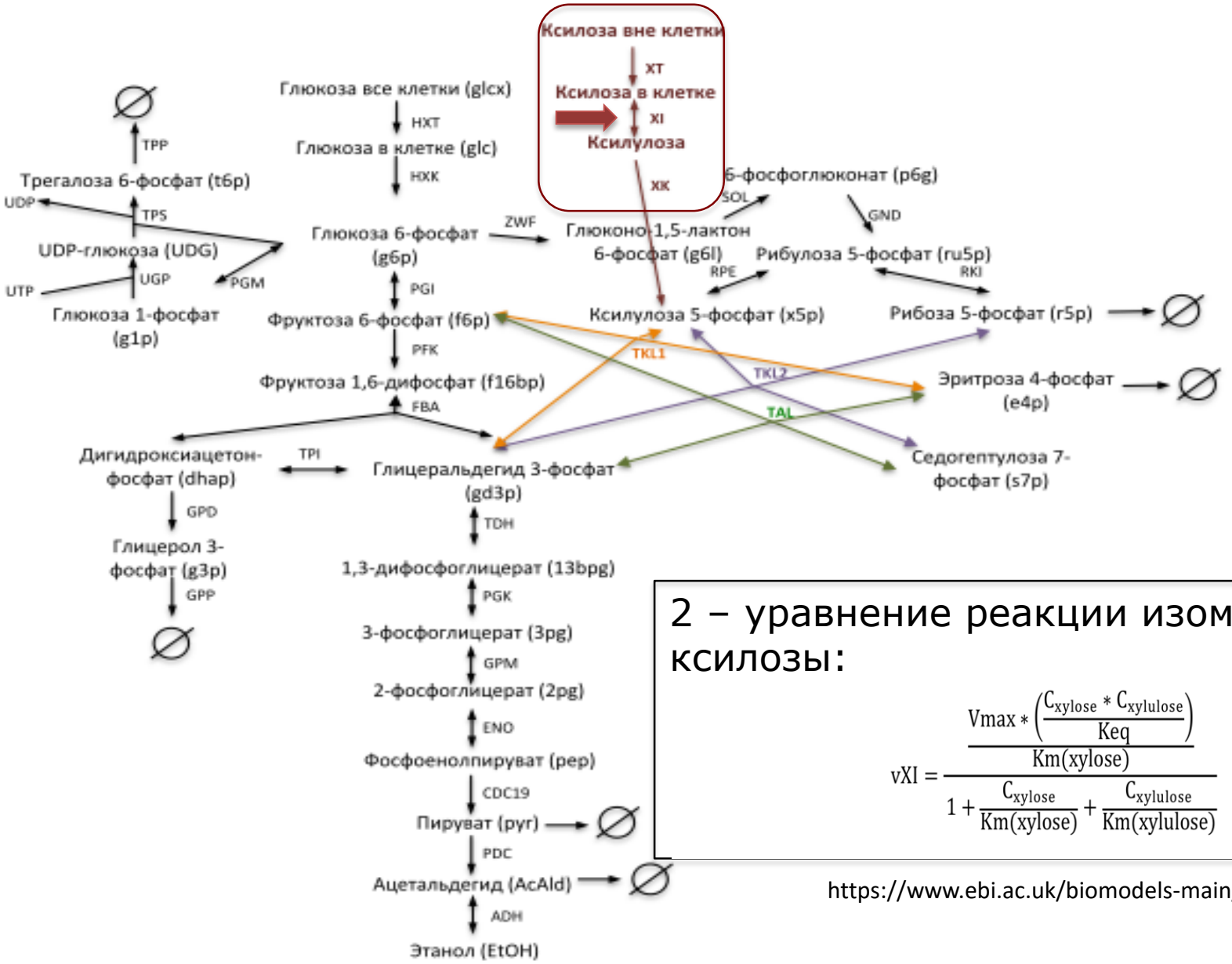


1 – уравнение реакции транспорта ксилозы в клетку:

$$vXT = \frac{Vmax * (C_{xylose\ extracellular} - C_{xylose\ cell})}{Km(xylose) + C_{xylose\ extracellular} + C_{xylose\ cell} + \frac{Ki * C_{xylose\ extracellular}}{Km(xylose)} * C_{xylose\ cell}}$$

Runquist D., Hahn-Hagerdal B., Radstrom P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* //Biotechnol Biofuels. – 2010. – Т. 3. – №. 5.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ И КСИЛОЗЫ

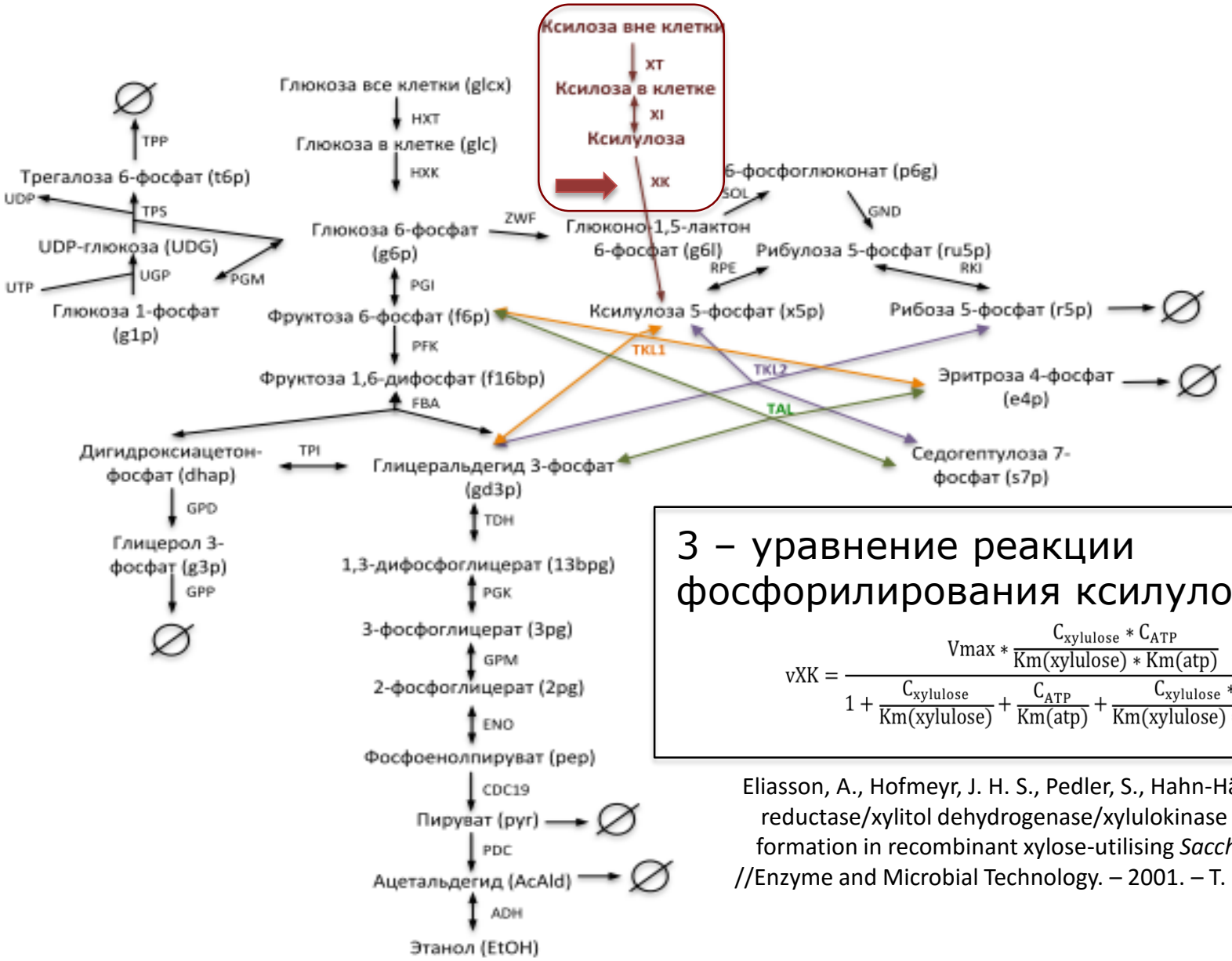


2 – уравнение реакции изомеризации ксилозы:

$$vXI = \frac{\frac{Vmax * \left(\frac{C_{xylose} * C_{xylulose}}{Keq}\right)}{Km(xylose)}}{1 + \frac{C_{xylose}}{Km(xylose)} + \frac{C_{xylulose}}{Km(xylulose)}}$$

https://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/BIOMD0000000470

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ И КСИЛОЗЫ



3 – уравнение реакции фосфорилирования ксилулозы:

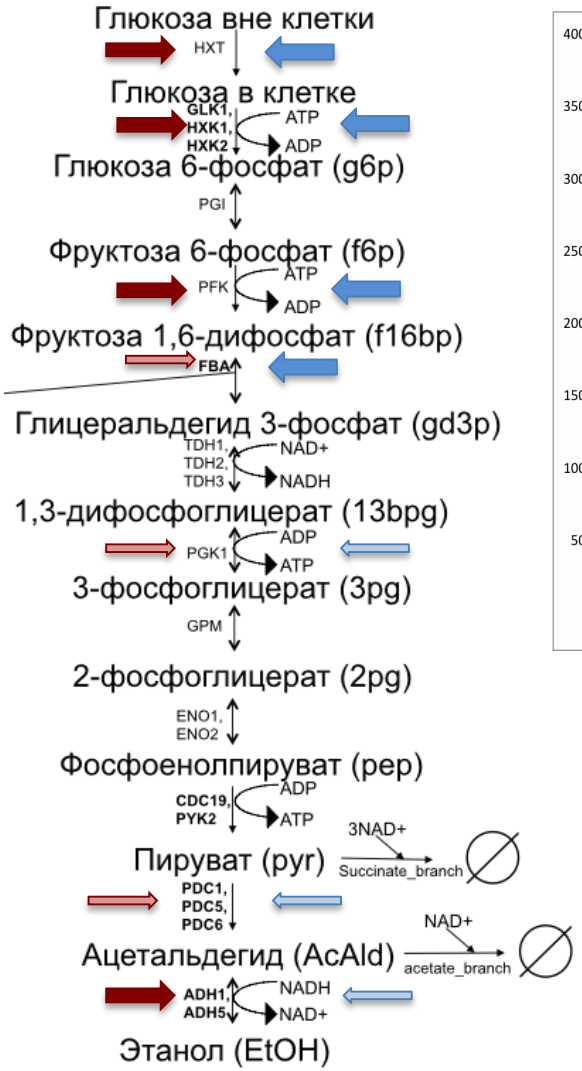
$$vXK = \frac{Vmax * \frac{C_{xylulose} * C_{ATP}}{Km(xylulose) * Km(atp)}}{1 + \frac{C_{xylulose}}{Km(xylulose)} + \frac{C_{ATP}}{Km(atp)} + \frac{C_{xylulose} * C_{ATP}}{Km(xylulose) * Km(atp)}}$$

Eliasson, A., Hofmeyr, J. H. S., Pedler, S., Hahn-Hägerdal, B.The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* //Enzyme and Microbial Technology. – 2001. – Т. 29. – №. 4. – С. 288-297.

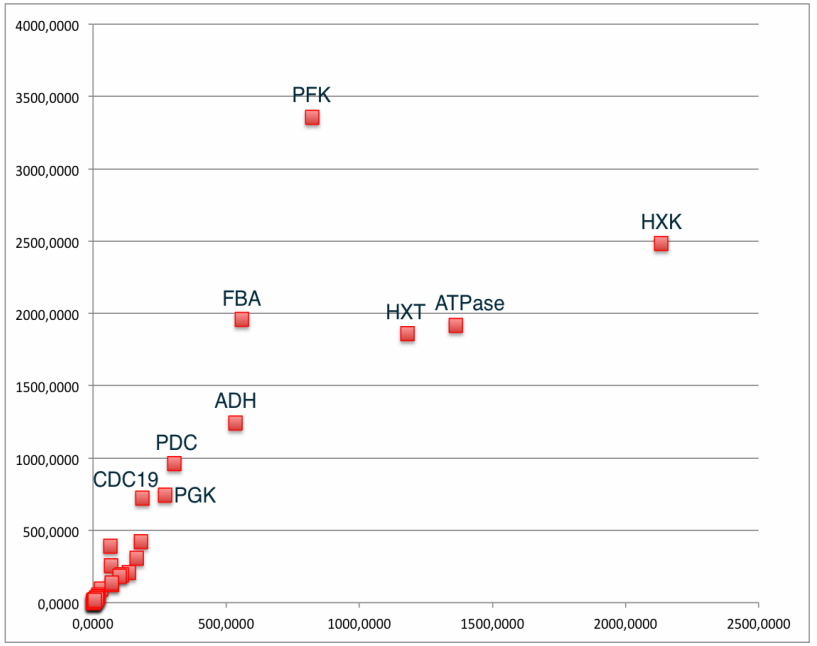
АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КОМПЛЕКСНОЙ МОДЕЛИ

Логический «ручной» анализ чувствительности

Название фермента	Значение N, %
HXK	69,7232
ATPase	59,0990
HXT	54,1055
ADH	48,9206
PFK	45,9355
PDC	40,3916
PGK	38,0522
FBA	36,4743
CDC19	30,9550
TDH	29,9596
TPS	23,1723
GPD	20,1991
TPP	13,5090



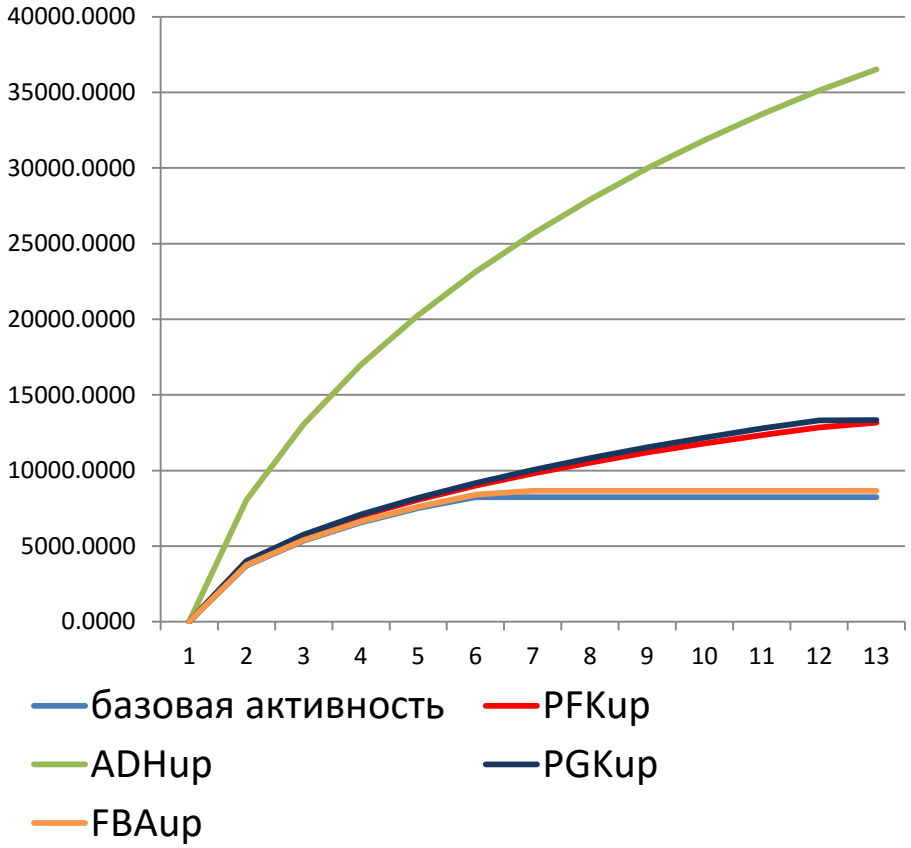
Анализ чувствительности в пакете SAFE-Toolbox



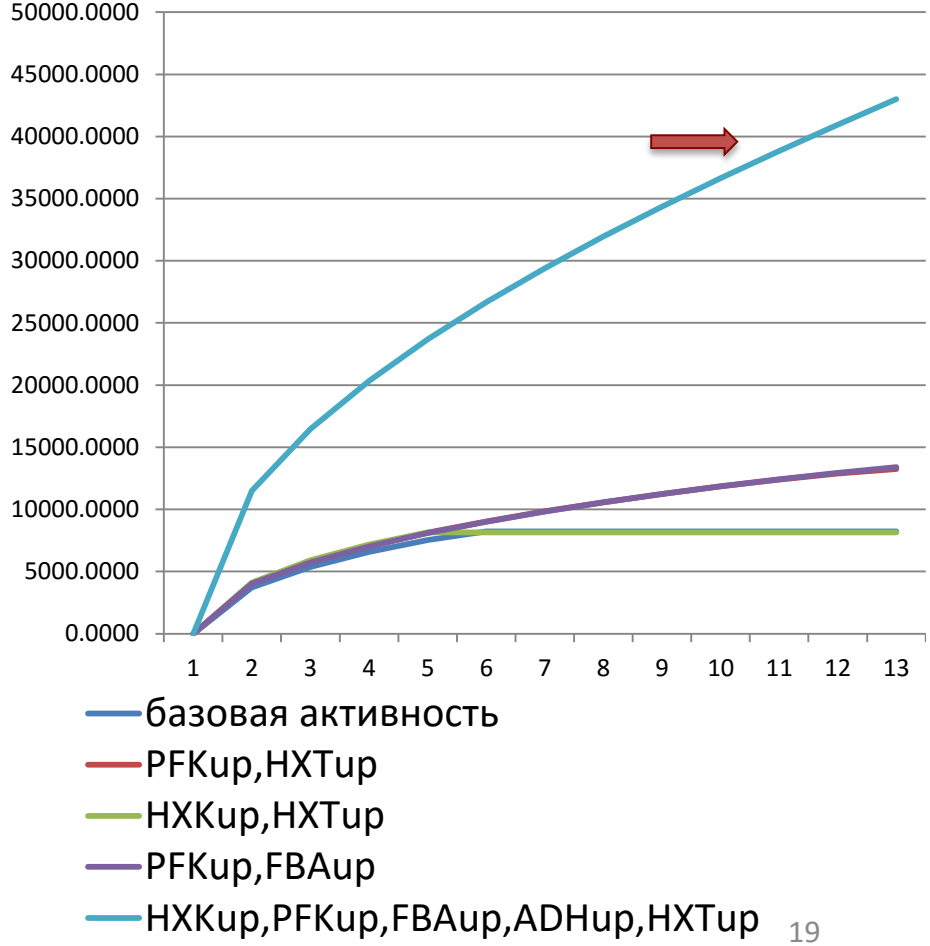
http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364815215001188

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЗНАЧЕНИЙ Vmax КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ НА ДИНАМИКУ СИНТЕЗА ЭТАНОЛА

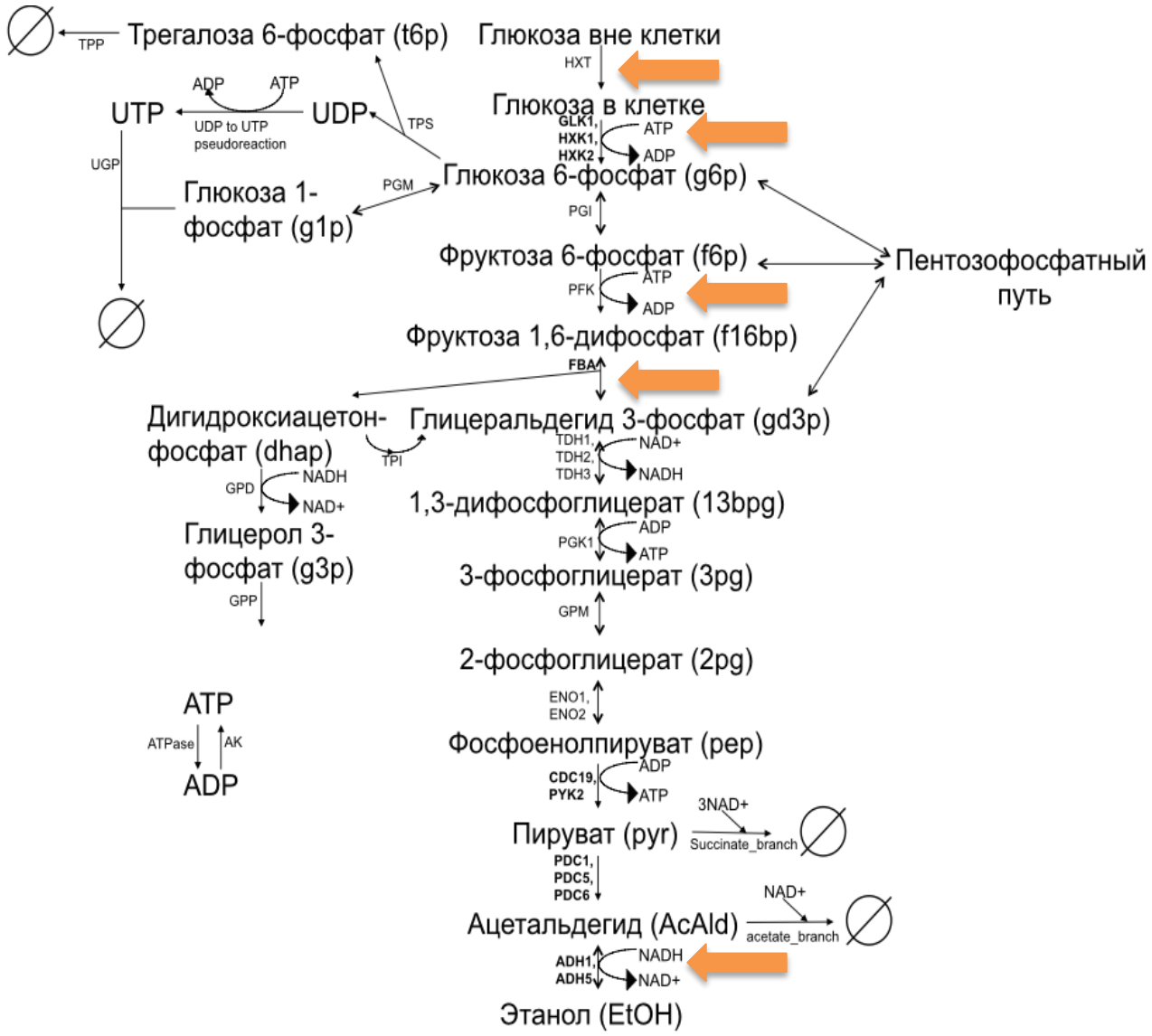
Увеличение активности отдельных ферментов



Увеличение активности групп ферментов



ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЗНАЧЕНИЙ Vmax КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ НА ДИНАМИКУ СИНТЕЗА ЭТАНОЛА



ВЫВОДЫ

1. Собрана векторная конструкция для введения гена ксилозоизомеразы в геном *S. cerevisiae;*

2. Расширена модель гликолиза и пентозофосфатного пути за счет добавления гетерологического пути утилизации ксилозы. Комплексная модель адаптирована к имеющимся данным по стационарным концентрациям метаболитов;

3. На основе реконструированной модели был проведен теоретический анализ метаболизма глюкозы и ксилозы в клетке *S. cerevisiae*. Анализ параметрической чувствительности позволил выделить следующие ключевые ферменты, значимо влияющие на стационарную концентрацию этанола: гексокиназа, фосфофруктокиназа, транспортер гексоз, фруктозодифосфатальдолаза и алкогольдегидрогеназа; а также показать, что одновременное увеличение активности этих ферментов наибольшим образом увеличивает продукцию этанола.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Розанову Алексею Сергеевичу,

Казанцеву Федору Владимировичу,

Малуп Татьяне Константиновне

ДОСТИЖЕНИЯ СТУДЕНТА ЗА ВРЕМЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

Публикации:

1. Bryanskaya, A. V., Rozanov, A. S., Logacheva, M. D., Kotenko, A. V., & Peltek, S. E. Draft genome sequence of *Geobacillus icigianus* strain G1w1 isolated from hot springs in the Valley of Geysers, Kamchatka (Russian Federation). *Genome announcements*, 2014, *2*(5), e01098-14.
2. Rozanov, A. S., Bryanskaya, A. V., Kotenko, A. V., Malup, T. K., & Peltek, S. E. Draft genome sequence of *Anoxybacillus flavithermus* strain 25, isolated from the Garga hot spring in the Barguzin Valley, Baikal Region, Russian Federation. *Genome announcements*, 2014, *2*(6), e01258-14.
3. A.S. Rozanov, A.V. Kotenko, I.R. Akberdin, S.E. Peltek. Recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from plant biomass. Вавиловский Журнал Генетики И Селекции, 2014, Том 18, № 4/2