

**UNIVERSITATEA "DUNĂREA DE JOS"
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR**

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE
GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂTĂȚIRII PROCEDEELOR
FERMENTATIVE TRADIȚIONALE**

**Doctorand
Biolog LEONTINA GURGU**

**Coordonator științific
Prof. Dr. Ing. ANCA NICOLAU**

**GALAȚI
2010**

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

ROMÂNIA
MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI SPORTULUI
UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS DIN GALAȚI

Strada Domnească nr. 47, cod poștal 800008
Galați, România
E-mail: rectorat@ugal.ro



Tel: (+4) 0336-130.109; 0336-130.108; 336-130.104
Fax: (+4) 0236 - 461.353
www.ugal.ro

28002/16.10.2012

Către

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați vă face cunoscut că în data de _____ ora _____, în sala _____, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată : "Studii privind utilizarea tehnicilor de inginerie genetică în vederea îmbunătățirii procedeelor fermentative tradiționale", elaborată de domnul/doamna _____, GURGU LEONTINA, în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

Președinte:

Prof.dr.ing. Petru ALEXE
Decan – Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Conducător de doctorat:

Prof.dr.ing. Anca NICOLAU
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Referent 1:

Prof.dr.biolog Tatiana VASSU DIMOV
Universitatea din București

Referent 2:

Cercet.șt.gr.I dr. Julio POLAINA MOLINA
Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Spania

Referent 3:

Conf.dr.biolog Vasilica BARBU
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică. În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa Universității, str. Domnească nr. 47, 800008 - Galați, Fax - 0236 / 461353.

RECTOR,
Prof.dr.ing. Viorel MINZEAT

SECRETAR DOCTORAT,

Ing. Luiza AXINTE

CUPRINS

I. OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT	5
II. STUDIU DOCUMENTAR	7
1. PROGRESE ALE INGINERIEI METABOLICE LA SACCHAROMYCES CEREVISIAE	7
1.1. Introducere	7
1.2. Ingineria metabolică inversă	10
1.3. Schimbarea nivelului proteinelor celulare prin inginerie metabolică	11
1.4. Controlul reglării expresiei genice	14
1.5. Activitatea enzimatică <i>in vivo</i>	15
2. ÎMBUNĂȚĂȚIREA PROPRIETĂȚILOR FERMENTATIVE LA SACCHAROMYCES CEREVISIAE PRIN METODE GENETICE	17
2.1. Introducere	17
2.2. Diversificarea gamei de substraturi metabolizabile la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.3. Toleranța la substanțele inhibitorii prezente în hidrolizatele lignocelulozice	27
2.4. Reducerea produșilor secundari ai fermentație	28
3. BETA-GLUCOZIDAZELE MICROBIENE	31
3.1. Introducere	31
3.2. Clasificarea β-glucozidazelor microbiene	32
3.3. Sursele și caracteristicile β-glucozidazelor utilizate în clonare	34
3.4. Modul de acțiune al β-glucozidazei	40
3.5. Aplicații ale beta-glucozidazelor microbiene	42
III. STUDIU EXPERIMENTAL	46
4. MATERIALE ȘI METODE EXPERIMENTALE	46
4.1. Materiale	46
4.1.1. Tulpini microbiene	46
4.1.2. Medii de cultură	47
4.1.3. Primeri utilizați	49
4.1.4. Vectori utilizați în procesul de clonare	54
4.1.5. Soluții tampon	55
4.1.6. Echipamente	55
4.2. Metode de analiză	55
4.2.1. Tehnici de manipulare și analiză ADN	55
4.2.1.1. Izolarea moleculelor de ADN celular	55
4.2.1.2. Tratamentele enzimatică ale moleculelor ADN	57
4.2.1.3. Electroforezele ADN în geluri de agaroză	58
4.2.1.4. Purificarea fragmentelor ADN din gelurile de agaroză	59
4.2.1.5. Reacțiile de polimerizare în lanț (PCR)	60
4.2.1.6. Purificarea fragmentelor ADN amplificate	60
4.2.1.7. Secvențierea fragmentelor ADN	60
4.2.1.8. Protocoale de lucru pentru construcția plasmidelor epizomale	61
	62

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

4.2.2. Tehnici de transformare a microorganismelor	62
4.2.2.1. Transformarea celulelor bacteriene	63
4.2.2.2. Transformarea tulpinilor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
4.2.3. Metode de caracterizare biochimică și moleculară a β-glucozidazei	64
4.2.3.1. Structura conformațională a β-glucozidazei	64
4.2.3.2. Determinarea activității enzimatică a β-glucozidazei hibrid	
4.2.3.3. Determinarea activității enzimatică a glucoamilazei de la <i>Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus</i>	66
4.2.3.4. Dializa și deglicozilarea proteinelor	66
4.2.3.5. Separarea proteinelor în geluri denaturante de poli(acrilamidă) (SDS-PAGE)	67
4.2.3.6. Cromatografia de excludere moleculară	68
4.2.3.7. Purificarea proteinelor	69
4.2.3.8. Determinarea masei moleculare.....	70
4.2.4. Metode de evaluare a fermentației alcoolice.....	70
4.2.4.1. Fermentația alcoolică în mediu YP+6% celobioză.....	71
4.2.4.2. Fermentația alcoolică în mediu YP cu 28% celobioză.....	71
4.2.4.3. Determinarea concentrației de etanol.....	
4.2.4.4. Analiza mediului de fermentație cu sistemul cromatografic DIONEX.....	71
5. CLONAREA GENEI <i>BGL1</i> ȘI A SECVENȚELOR ADN CODIFICATOARE A DOMENIILOR NON-CATALITICE, SPS-STRD ȘI FLD ÎN VECTORUL DE EXPRIMARE <i>pEMBLyex4</i>	73
5.1. Clonarea $\Delta bgl1$ și a <i>bgl1</i> în vectorul <i>pCR2.1-TOPO</i>	73
5.2. Construcția vectorului plasmidial de exprimare <i>pST-Bgl1</i>	76
5.3. Construcția vectorului plasmidial de exprimare <i>pBgl1</i>	78
5.4. Construcția vectorului plasmidial <i>pSPS-Bgl1</i>	79
5.5. Construcția vectorilor <i>pSPS-Bgl1-D0</i> și <i>pSPS-Bgl1-D1</i>	81
5.6. Construcția vectorului plasmidial <i>pSTA1-FLD</i>	82
5.7. Concluzii	86
6. CARACTERIZAREA BIOCHIMICĂ ȘI MOLECULARĂ A BETA GLUCOZIDAZEI NATIVE DE LA <i>SACCHAROMYCOPSIS FIBULIGERA</i> ȘI A ENZIMELOR HETEROLOAGE CREATE LA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	88
6.1. Analiza structurii β-glucozidazei produsă de <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	88
6.2. Structura enzimelor recombinat Sta1-Bgl1	91
6.3. Localizarea și activitatea enzimelor chimerice obținute	93
6.4. Mărimile proteinelor heteroloage și glicozilarea	96
6.5. Concluzii	103
7. STUDIUL ACTIVITĂȚII β-GLUCOZIDAZEI HIBRID OBȚINUTĂ ÎN TULPINI DE DROJDII INDUSTRIALE DIN GENUL <i>SACCHAROMYCES</i>	106
7.1. Construcția și analiza vectorului plasmidial de exprimare <i>pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	106
7.2. Exprimarea genei hibrid SPS-Bgl1 în tulpini de drojdii industriale sub controlul transcripțional al promotorului inductibil <i>CYCGAL</i>	110

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂTĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

7.3. Construcția și analiza vectorului de exprimare <i>pAct-SPS-Bgl1-3003</i>	119
7.4. Exprimarea genei <i>SPS-Bgl1</i> în tulpini de drojdii industriale sub controlul transcripțional al promotorului constitutiv, <i>Actp</i>	124
7.5. Concluzii	131
8. FERMENTAȚIA ALCOOLICĂ PE SUBSTRAT CELOBIOZIC REALIZATĂ DE TULPINILE INDUSTRIALE DIN GENUL <i>SACCHAROMYCES</i> TRANSFORMATE CU <i>pACT-SPS-Bgl1-3003</i>	133
8.1. Fermentația alcoolică pe substrat cu 6% celobioză	133
8.2. Fermentația alcoolică pe substrat cu 28% celobioză	136
8.3. Concluzii	142
9. CONCLUZII FINALE	144
REZULTATELE ȘTIINȚIFICE	152
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	154
ANEXE	179

I. OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

Obiectivul major al tezei, utilizarea tehnicilor de inginerie genetică pentru îmbunătățirea performanțelor β -glucozidazei izolată de la *Saccharomycopsis fibuligera* și transferul ei la drojdii din genul *Saccharomyces*, în vederea eficientizării fermentației substraturilor celobiozice și a celodextrinelor este de mare actualitate și importanță științifică.

Pentru atingerea acestui obiectiv major au fost urmărite și concretizate anumite obiective specifice:

1. Construcția și analiza unor gene hibrid *STA1/bgl1*, clonarea și exprimarea lor în tulpina de laborator *Saccharomyces cerevisiae* *BY4741*;
2. Analiza biochimică a enzimelor hibrid obținute prin interschimbul domeniilor non-catalitice: domeniul serină-treonină (*STRD*) din structura glucoamilazei și domeniul cu structură, *β -sandwich*, de la capătul carboxil-terminal al β -glucozidazei (domeniul *fibronectin-like*);
3. Elucidarea funcțiilor biologice ale acestor domenii non-catalitice din structura glucoamilazei și β -glucozidazei;
4. Exprimarea genei codificatoare a enzimei heteroloage, selectată ca având cea mai bună activitate, în diferite tulpini de drojdii industriale;
5. Testarea tulpinilor industriale, obținute prin transformare, în fermentația alcoolică cu substrat celobiozic.

Hidroliza enzimatică a celulozei în scopul producerii de bioetanol implică acțiunea unei baterii de enzime, precum: endoglucanaze, celobiohidrolaze și β -glucozidaze. Beta-glucozidazele nu numai că sunt importante în ultima etapă a procesului hidrolitic dar cresc și eficiența procesului, deoarece acumularea celobiozei în cadrul sistemului inhibă acțiunea endoglucanazelor și celobiohidrolazelor. Cu toate că, β -glucozidaza (*Bgl1*) și glucoamilaza (*Sta1*) sunt enzime de interes biotehologic, din punct de vedere funcțional, ele prezintă anumite blocaje care le restricționează potențialul fermentativ. Din punct de vedere structural, glucoamilazele codificate de genele *STA* ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* sunt proteine care au două domenii: unul amino-terminal, bogat în serină și treonină (*STRD*) și unul carboxil-terminal,

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

domeniul catalitic, ce are o structură tipică proteinelor familiei 15 a glicozid hidrolazelor. Existența unor domenii similare cu domeniul STRD și în alte proteine extracelulare de la drojdii a condus către ideea implicării acestui domeniu în secreție (Adam și colab., 2004; Latorre-Garcia și colab., 2005). Combinând secvențele și datele cristalografice ale exoglucanazelor și β -glucozidazelor din cadrul acestei familii s-a evidențiat faptul că, domeniul catalitic al acestor enzime prezintă la capătul carboxil-terminal o structură de tipul β -sandwich a cărei funcție este încă necunoscută (Pozzo și colab., 2010). De asemenea, *Saccharomyces cerevisiae* nu poate secreta Bgl1 iar utilizarea acesteia la nivel industrial nu poate fi realizată (Machida și colab., 1988). Astfel, tehnicile biologiei moleculare devin instrumentele care au stat la baza atingerii obiectivelor menționate anterior.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat este prezentată pe 184 de pagini și se compune din două părți: o parte de studiu documentar care conține 3 capitole și o parte de cercetări originale, structurate pe 5 capitole. Lucrarea conține 77 figuri și 20 de tabele. Pentru elaborarea tezei s-au utilizat 247 referințe bibliografice din literatura de specialitate și 6 site-uri web.

II. STUDIUL DOCUMENTAR

Studiul documentar s-a realizat cu scopul de a se evidenția importanța utilizării drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* în procesele de clonare precum și în procesele fermentative. Obținerea unei tulpini de drojdie, din genul *Saccharomyces*, capabilă să metabolizeze o gamă largă de substraturi constituie interesul multor cercetători din întreaga lume. Astfel, **capitolul 1** al studiului documentar, *Progrese ale ingineriei metabolice la Saccharomyces cerevisiae*, enumeră motivele pentru care această drojdie este preferată în cercetare precum și căile prin care se poate modifica nivelul celular al unei anumite proteine.

În **capitolul 2** sunt prezentate informații referitoare la modalitățile de îmbunătățire prin metode genetice ale proprietăților fermentative ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* pentru ca, în **capitolul 3**, să se aducă informații referitoare la clasificarea β -glucozidazelor microbiene, a surselor și caracteristicilor acestora pentru utilizarea în procesul de clonare, precum și a modului lor de acțiune.

Saccharomyces cerevisiae este fără îndoială cel mai investigat microorganism eucariot care a permis nu numai înțelegerea biologiei celulei eucariote, ci și pe cea a celulei umane. *Saccharomyces cerevisiae* reprezintă un microorganism preferat în cercetare deoarece este nepatogen, ușor de cultivat în laborator, implicat în obținerea unor numeroase produse alimentare pe cale fermentativă (vin, bere, pâine, etanol), definit drept GRAS (Generally Recognized as Safe) adică ca un organism sigur, netoxic, de către U.S. Food and Drug Administration (Byrne și colab., 2005; Hahn-Hagerdal și colab., 2001). Un alt motiv important al aplicabilității sale în afară de cel biotehnologic, îl constituie susceptibilitatea la modificări genetice prin tehnologia ADN-ului recombinant, proprietate care a fost facilitată și de cunoașterea întregului său genom (Goffeau și colab., 1996). Baze de date precum *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org>) și *Comprehensive Yeast Genome Database* (<http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast>) conțin o cantitate enormă de informații referitoare la cadrele

deschise citirii (*Open Reading Frames*) ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* sau despre producții de expresie ai genelor. Ca o completare, bazele de date oferă accesul la rezultatele studiilor de DNA microarray (<http://transcriptome.ens.fr/ymg/index.php>) și la informațiile legate de relațiile dintre rețelele proteice. Totodată *Saccharomyces cerevisiae* are un rol major în cercetarea aplicată datorită remarcabilei sale capacități de a produce etanol și dioxid de carbon din glucoză. Această drojdie este relativ tolerantă la valori scăzute ale pH-ului și la concentrații înalte de glucide și etanol, aspect pozitiv pentru industria fermentativă prin riscul scăzut de contaminare. Mai mult decât atât, această drojdie este extrem de rezistentă la inhibitorii prezenți în biomasa vegetală hidrolizată și este capabilă de a crește în condiții anaerobe realizând astfel fermentația. Aceste elemente constituie principalele motive pentru care *Saccharomyces cerevisiae* a fost explorată și la nivel industrial, accentul fiind pus pe obținerea prin fermentație a unor importanți compuși biochimici precum: glicerolul, propandiolul, acizii organici, alcoolii steroizi sau izoprenoizi. Aceste substanțe sunt utilizate fie direct în industria farmaceutică sau chimică, fie reprezintă precursori pentru viitoarele sinteze chimice sau enzimatic. Ingineria genetică a tulpinilor de drojdii utilizate în diferite industrii a ridicat numeroase provocări pentru cercetători deoarece calitatea senzorială a pâinii sau a băuturilor alcoolice este determinată de numeroși compuși, care trebuie să fie prezenți în cantități foarte bine echilibrate. Optimizarea anumitor căi metabolice sau trăsături fenotipice, fără să fie afectat acest echilibru, devine o provocare a acestui domeniu. Pe de altă parte, ingineria genetică aplicată pentru sectorul industrial se confruntă cu tulpini de drojdii care au blocate anumite caracteristici comparativ cu tulpinile de laborator. Totodată, tulpinile modificate genetic utilizate în tehnologia produselor alimentare sau a băuturilor alcoolice, pot fi incluse în alimentație sau eliberate în mediul înconjurător. De aceea, aceste produse pentru a căror preparare a fost necesară utilizarea organismelor modificate genetic (*GMO-Genetically Modified Organisms*) trebuie să treacă evaluarea riscurilor pentru sănătate. La nivel internațional Codex Alimentarius Commission a stabilit principii pentru evaluarea securității produselor care au la bază organismele modificate genetic (http://www.who.int/foodsafety/biotech/codex_taskforce/en/). *Saccharomyces cerevisiae* este capabilă să fermenteze glucoza, manoza, fructoza, maltoza și zaharoza, dar nu poate fermenta celobioza, xiloza, sau arabinoza, principalele glucide din resursele lignocelulozice derivate din plante. Extinderea gamei de substraturi asupra cărora poate acționa *Saccharomyces cerevisiae* reprezintă o opțiune importantă în utilizarea materialelor neprelucrate, precum producții nefolositori din agricultură sau pentru sinteza unor compuși biotehnologici la scală industrială. Un organism optim pentru producerea de etanol din biomasă lignocelulozică ar trebui să fie capabil să hidrolizeze poliglucide și să utilizeze toți compușii fermentabili pe care să-i transforme în etanol. Nici un microorganism cunoscut până în prezent nu prezintă toate aceste caracteristici. De exemplu, *Saccharomyces cerevisiae* nu poate utiliza celuloza sau hemiceluloza. Mai mult decât atât, nu poate utiliza multe din componentele rezultate în timpul hidrolizei biomasei lignocelulozice precum xiloză, arabinoză, acid glucuronic sau alte oligozaharide. Așadar, având în vedere rolul carbohidraților din hidrolizatele biovegetale în circuitul carbonului în natură, în producerea de combustibili și respectiv în economie, obținerea unei tulpini care să transforme eficient în etanol toate substraturile fermentescibile din biomasa vegetală este poate singura mare provocare a ingineriei genetice la drojdii. β -D-Glucozid glucohidrolazele (3.2.1.21) sau β -glucozidazele constituie un grup de enzime important din punct de vedere biologic, bine caracterizat, care hidrolizează legătura β -glucozidică dintre carbohidrați ducând la formarea de grupări aril-, amino- sau alchil- β -D-glucozidice, de glucozide cianogenice, de scurte lanțuri oligozaharidice sau de dizaharide. Genele pentru β -glucozidaze au fost izolate de la bacterii, mucegaiuri, drojdii, plante sau animale, clonate și exprimate în *Escherichia coli* sau gazde eucariote precum *Saccharomyces*

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

cerevisiae sau fungi filamentoși. *Saccharomyces cerevisiae* nu prezintă activitate β -glucozidazică și îi lipsește sistemul de metabolizare a celobiozei.

III. STUDIU EXPERIMENTAL

Experimentele tezei de doctorat sunt prezentate în 5 capitole, astfel:

Sub denumirea "Materiale și metode experimentale", **capitolul 4** marchează materialele, echipamentele și metodele de analiză care au fost folosite în diversele experimente.

În **capitolul 5**, "Clonarea genei *bgl1* și a secvențelor ADN codificatoare a domeniilor non-catalitice, SPS-STRD și FLD, în vectorul de exprimare *pEMBLyex4*":

- sunt descrise particularitățile clonării genei codificatoare a β -glucozidazei cu sau fără propria secvență semnal în vectorul de exprimare *pEMBLyex4*,
- este prezentată construcția unor gene heterologe pornindu-se de la *bgl1* – gena codificatoare a β -glucozidazei izolată din ADN-ul genomic al drojdiei *Saccharomycopsis fibuligera* și de la STA1 – genă codificatoare a glucoamilazei izolată de la *S. cerevisiae var. diastaticus*.
- este evidențiată exprimarea fragmentelor genice hibrid ST-Bgl1, SPS-Bgl1, SPS-Bgl1-D0 și SPS-Bgl1-D1 în tulpina de laborator *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 prin creșterea transformanților pe mediu cu celobioză.

Descrierea modelului structural al β -glucozidazei, purificarea și determinarea maselor moleculare ale enzimelor chimere obținute, constituie particularitățile **capitolului 6**, intitulat sugestiv "Caracterizarea biochimică și moleculară a beta-glucozidazei native de la *Saccharomycopsis fibuligera* și a enzimelor heteroloage create la *Saccharomyces cerevisiae*".

Capitolul 7, denumit "Studiul activității β -glucozidazei hibrid obținută în tulpini de drojdie industriale din genul *Saccharomyces*", se remarcă prin comparația activității β -glucozidazei hibrid în diferite tulpini de drojdie industriale, activitate enzimatică evidențiată pe substratul *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranozid și care, la nivel genic se află sub influența fie a promotorului inductibil *CYCGAL*, fie a promotorului constitutiv *Actp*.

În **capitolul 8**, "Fermentația alcoolică pe substrat celobiozic realizată de tulpinile industriale din genul *Saccharomyces* transformate cu *pACT-SPS-BGL1-3003*", sunt prezentate rezultatele experimentelor de fermentație alcoolică realizată de tulpinile de drojdie industriale capabile să exprime fragmentul genic SPS-Bgl1 sub influența promotorului constitutiv, *Actp*.

Capitolul 4

Materiale

Tulpinile bacteriene utilizate ca celule gazdă în experimentele de clonare genică, precum și caracteristicile lor genetice sunt descrise în tabelul 4.1:

Tabelul 4.1. Tulpini bacteriene

Tulpina	<i>Escherichia coli</i>	Caracteristici genetice
B20	DH5 α	F' Phi 80d, lacZ Delta M15, Delta (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK-mK+), phoA, supE44, lambda- thi-1
B73	XL1-BLUE (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Tulpinile de drojdii (de laborator și industriale) utilizate, precum și caracteristicile lor sunt prezentate în tabelul 4.2:

Tabelul 4.2. Tulpini de drojdii

Tulpina	Specia	Caracteristici	Sursa
ATCC 9947	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>		Colecția laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.
BY4741	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MATa his3 leu2 met15 ura3	Brachmann și colab. (1998).
FJF135	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	drojdie de vin	Benitez și colab., 1983
FJF305	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	drojdie de vin	Colecția "J. Conde".
Y370	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	drojdie de panificație	Colecția laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.
Y 28	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	drojdie de bere	NCYC: National Collection of Yeast Cultures, Norwich, UK.
NYCY 512	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	drojdie de bere	Colecția laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.
Y111	<i>Saccharomyces boulardii</i>	tulpină probiotică	Bristol Myers, Edwards-Ingram și colab. 2007.
NYCY 519	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	drojdie de bere	Colecția laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.
NYCY 1324	<i>Saccharomyces bayanus</i>	drojdie de vin	Colecția laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.
HY48	<i>Saccharomyces unisporus</i>	drojdie de kefir	Colecția laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.
NYCY 491	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	Colecția laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.
NYCY 499	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	petite	Colecția laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.

Primeri utilizați

Tabelul 4.4. Designul secvențelor oligonucleotidice utilizate ca primeri în amplificarea domeniilor de interes

Oligo (SIGMA)	Secvențele oligonucleotidice 5' - 3' cu situsurile endonucleazice inserate	Endonucleaza de restricție	Scop
JM 583	AGCACCGCTAGCAACCTTTTTCTGTCCGCTGGAGCCAC	NheI	Amplifică vectorul pS2 cu domeniul Ser-Thr din STA1, antisens.
GP571	GTCTAGAGTCGACCTGCAGGC	XbaI	Amplifică vectorul pS2, sens
SA 639	GCTGGTGCTAGCGGTGTCCCAATTCAA AACTATACCCAG	NheI	Amplifică domeniul catalitic al Bgl1, sens.
SA640	ACCTCTAGATCAAATAGTAAACAGGACA GATGTC	Xba I	Amplifică domeniul catalitic al Bgl1, antisens.
JM700	CGAGTGTCTAGATTAAATAGTAAACAGG CAGATGTC	XbaI	Amplifică domeniul catalitic al Bgl1, sens.
SA641	GCTGGATCCATGTTGATGATAGTACAGC TTTTGGTC	BamHI	Amplifică gena Bgl1 cu propria secvență semnal, sens
JM699	GTCCCAATTCAAACTATAACCCAG	-	Amplifică gena Bgl1, fără secvența semnal, sens.
LG679	TTCGAGCTCTTTCCAAGTCACTAGTTC CTAGAG	SacI	Amplifică STD-Bgl1 din ADN genomic, sens
LG685	GCTTAAATGCGTACTTATATGCGTC	-	Secvențierea vectorului pEMBLYex4, sens
LG686	GCAACTTTAGTGCTGACACATACAG	-	Secvențierea vectorului pEMBLYex4, antisens

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

LG689	ACCTCTAGATTATTAGGTAGCTGGTTCA GGCAACTC	XbaI	Amplifică antisens	SPS-Bgl1-D0,
JM737	GACCTCCCACAAAGCATCGTTG	-	Amplifică antisens	SPS-Bgl1-D1,
JM741	TGATCTAGAGTCGACCTGCAGG	-	Amplifică antisens	pEMBLYex4,
JM696	ACCCAAAGCTGAGTTAAATAGAAGC		Amplifică secvența semnal din Sta1 (SPS), antisens	
JM701	CGTGACGAGCTCATGGTAGGCCTCAAA AATCCATATAC	SacI	Amplifică Sta1-sens	
JM702	CGTCTGGCGGCCCGCTCAAACCTCTGTAA AACTTCTTGTC	NotI	Amplifică Sta1-antisens	
JM692	CTACTACGGTTTGCTCTACAGG	-	Secvențierea STD-Bgl1, sens	
JM693	TTGGCAATTAGATCCATGTGTTGG	-	Secvențierea STD-Bgl1, antisens	
JM697	CGTCTGTCTAGAA TGGTAGGCCTCAAA AATCCATATAC	Xba I	Amplifică SPS-BGL1 din pEMBLYex4, sens	
JM698	GCTACC GTCGACTCAAATAGTAAACAG GACAGATGTC	Sal I	Amplifică SPS-BGL1 din pEMBLYex4, antisens	
JM703	CGTCTGGCGGCCCGCTTTGGTAAAGCAA CCCATCAGG	NotI	Amplifică Fibronectin-Like Domain (FLD), sens.	

Vectori utilizați în procesul de clonare

Plasmidele utilizate ca vectori ai genelor de interes, în procesul de clonare sunt prezentate în tabelul 4.5:

Tabelul 4.5. Plasmide utilizate

Plasmid	Sursa	Utilizare
pCR-TOPO 2.1	Invitrogen	Clonarea genei <i>bgl1</i> amplificată cu SA639/SA640 și SA640/ SA641.
pEMBLYex4	Cesareni și Murray, 1987	Exprimarea genei <i>bgl1</i> în <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741.
pS ₂	Garcia și colab., 2007	Construcția plasmidului pSTA-FLD
pKS2	Garcia et all., 2007	Construcția plasmidelor pGal-SPS-Bgl1-3003, pAct-SPS-Bgl1-3003.

Prin studii proprii, ca demersuri pentru atingerea obiectivelor stabilite au fost construiți 9 vectori plasmidiali care sunt prezentați în tabelul 4.6:

Tabelul 4.6. Vectori plasmidiali construiți

Plasmid	Scop
pBgl1	Exprimării genei <i>bgl1</i> în <i>S. cerevisiae</i> BY4741.
pST-Bgl1	Eficiențizarea exprimării genei <i>bgl1</i> în <i>S. cerevisiae</i> BY4741
pSPS-Bgl1	Evidențierea rolului domeniului serină-treonină (STRD).
pEMBLYex4	Utilizat drept control în cadrul experimentelor.
pSPS-Bgl1-D0	Elucidarea rolului domeniului fibronectin-like (FLD).
pSPS-Bgl1-D1	Elucidarea rolului domeniului fibronectin-like (FLD).
pSTA1-FLD	Exprimarea genei <i>STA1</i> în <i>S. cerevisiae</i> BY4741 și elucidarea rolului domeniului fibronectin-like (FLD).
pGal-SPS-Bgl1-3003	Exprimarea genei hibrid SPS-Bgl1 în <i>S. cerevisiae</i> BY4741 și în tulpinile de drojii industriale sub promotor inductibil.
pAct-SPS-Bgl1-3003	Exprimarea genei hibrid SPS-Bgl1 în <i>S. cerevisiae</i> BY4741 și în tulpinile de drojii industriale sub promotor constitutiv.

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Echipamente

Echipamentele utilizate în cadrul experimentelor sunt echipamente moderne, specifice biologiei moleculare și se găsesc în dotarea laboratorului "Enzyme Structure and Function", IATA, Spania.

Tabelul 4.8. Echipamente utilizate

Echipament	Utilizare
Termocicler Gene Amp PCR System 2400	Amplificare genelor de interes; Ligarea fragmentelor genice.
Spectrofotometru UV/vis DU530, Beckman	Măsurarea absorbției la diferite lungimi de undă (600 nm, pentru densitatea celulară; 410 nm pentru determinarea concentrației <i>p</i> -nitrofenolului; 450 nm pentru orto-dianizidină oxidată).
Nanodrop Spectrofotometru ND-1000	Cuantificarea acizilor nucleici (concentrație și puritate).
Aparat de electroforeză pentru geluri de agaroză, orizontal.	Separarea și identificarea fragmentelor ADN amplificate.
Sistem vertical de electroforeză pentru proteine	Separarea și identificarea proteinelor exprimate în <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Sistem cromatografic AKTA- purifier (GE-Healthcare)	Purificarea proteinelor heteroloage exprimate în <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Sistem cromatografic de înaltă performanță DIONEX ICS 3000 DC	Identificarea produșilor rezultați din fermentația alcoolică.
Fujifilm LAS 1000Plus IDX2 Intelligent Dark Box II (Pfizer)	Fotografierea gelurilor de agaroză.
Secvențiator ADN (Applied Biosystem, model 373A)	Secvențierea genelor și a plasmidelor construite.
Thermoblock	Incubarea tuburilor de reacție la o temperatură constantă.
Transiluminator cu UV	Vizualizarea benzilor ADN din gelurile de agaroză.
Termostat (Raypa)	Cultivarea microorganismelor.
Citometru Thoma	Numărarea microorganismelor.
Autoclav (Raypa)	Sterilizarea mediilor de cultură.
Balanță analitică AGN200C	Determinări gravimetrice.

Metode de analiză

Pentru realizarea experimentelor au fost utilizate:

- Tehnici de manipulare și analiză ADN: tratamentele enzimatiche ale moleculelor ADN, electroforezele ADN în geluri de agaroză, reacțiile de polimerizare în lanț (PCR), secvențierea fragmentelor ADN.
- Tehnici de transformare a microorganismelor: transformarea celulelor bacteriene, transformarea tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Metode de caracterizarea biochimică și moleculară a β -glucozidazei: determinarea structurii conformaționale a β -glucozidazei, determinarea activității enzimatiche a β -glucozidazei hibrid.
- Dializa și deglicozilarea proteinelor, separarea proteinelor în geluri denaturante de poli-acrilamidă (SDS-PAGE).
- Cromatografia de excludere moleculară, purificarea proteinelor, determinarea maselor moleculare.

- Metode de evaluare a fermentației alcoolice: fermentația alcoolică în mediu YP+6% celobioză, fermentația alcoolică în mediu YP cu 28% celobioză, determinarea concentrației de etanol, analiza mediului de fermentație cu sistemul cromatografic DIONEX HPAEC-PAD.

Capitolul 5

Având ca obiectiv obținerea de gene hibrid pornindu-se de la *bg11* (genă codificatoare a β -glucozidazei) s-au construit o serie de vectori plasmidiali care au fost ulterior utilizați pentru transformarea tulpinii de laborator *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, în vederea exprimării genelor inserate.

Clonarea $\Delta bg11$ și a *bg11* în vectorul pCR2.1-TOPO. Secvența nucleotidică a genei *bg11* a fost descoperită și declarată public de către Machida M., Ohtsuki I., Fukui S. and Yamashita I, în anul 1988 și se află în baza de date a NCBI (U.S. National Library of Medicine și National Institutes of Health), nr. M22475. Gena *bg11* prezintă o regiune codificatoare a secvenței semnal a β -glucozidazei, de 51 pb, și două regiuni care conțin informația genetică pentru domeniul catalitic respectiv pentru domeniul *fibronectin-like* (FLD) al aceleiași enzime (figura 5.1).

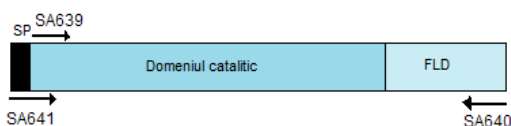


Figura 5.1. Reprezentarea schematică a structurii *bg11* de la *Saccharomycopsis fibuligera*; SP-regiunea codificatoare a secvenței semnal a β -glucozidazei; FLD-regiunea codificatoare a domeniului fibronectin-like a β -glucozidazei

Gena codificatoare a β -glucozidazei (Anexa 1) a fost amplificată din ADN-ul genomic al drojdiei *Saccharomycopsis fibuligera* utilizându-se oligonucleotidele SA641/SA640, respectiv SA639/SA640. Acest produs de amplificare a fost notat $\Delta bg11$. De asemenea, oligonucleotidele SA641/SA640 în reacția de amplificare determină formarea unui amplicon cu masa moleculară de 2631 pb, care s-a notat *bg11*. Produșii amplificați au fost clonați în vectorul pCR2.1-TOPO la nivelul situsurilor *EcoRI*.

Construcția vectorului plasmidial de exprimare pST-Bgl1. Vectorul plasmidial de exprimare, pS2 (Garcia și colab. 2005) a fost construit pe baza pEMBLYex4 și are ca insert gena STA1, codificatoare a glucoamilazei de la *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*. Gena STA1 conține alături de regiunea codificatoare a domeniului catalitic și a secvenței semnal a glucoamilazei (SPS) și o regiune codificatoare a aminoacizilor serină și treonină, denumită, domeniul serină-treonină (STRD). Adăugarea segmentului nucleotidic codificator al secvenței semnal de la STA1 la gena $\Delta bg11$ s-a realizat prin restricția enzimatică a pS₂ cu *NheI/XbaI*, enzime care înlătură din pS₂ segmentul codificator al domeniului catalitic lăsând astfel în vector doar secvența semnal a enzimei Sta1. La acest nivel a fost ulterior ligată gena $\Delta bg11$.

Construcția vectorului plasmidial de exprimare pBgl1. Pentru realizarea unei comparații între nivelul exprimării genei *bg11* și cel realizat de aceeași genă care conține segmentul nucleotidic codificator al secvenței semnal de la STA1, s-a construit pBgl1. Pentru obținerea acestui vector plasmidial, gena *bg11* a fost extrasă din pCR2.1-TOPO-*bg11* cu enzimele de restricție *XhoI/HindIII* (figura 5.4) și ligată în vectorul de exprimare pEMBLYex4, de asemenea restricțiat la nivelul *Sall/HindIII*. În figura 5.8 este configurat modul de inserție a genei codificatoare a β -glucozidazei în vectorul de exprimare pEMBLYex4, la nivelul *Sall/HindIII*.

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

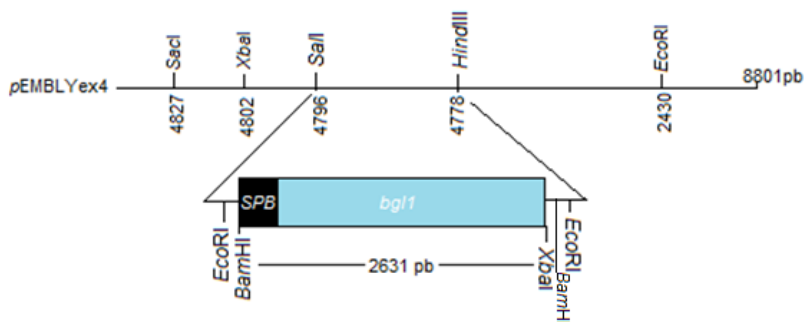


Figura 5.8. Reprezentarea schematică a locului de inserție a *bgl1* în pEMBLyex4 și a endonucleazelor de restricție existente în acest vector de exprimare

Construcția vectorului plasmidial pSPS-Bgl1. Scopul construirii pSPS-Bgl1 a fost acela de a obține un vector plasmidial de exprimare care să conțină ADN-ul heterolog codificator al β -glucozidazei cu secvența semnal a glucoamilazei de la *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, putându-se astfel evidenția dacă domeniul Ser-Thr eliminat este sau nu implicat în secreția enzimatică. Astfel, plasmidul pSPS-Bgl1 conține doar gena *bgl1* cu segmentul codificator al secvenței semnal din STA1 (SPS).

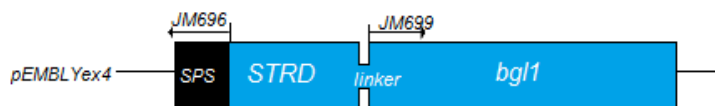


Figura 5.10. Reprezentarea liniară a vectorului pST-Bgl1 și a locului de atașare a oligonucleotidelor JM696 și JM699 utilizate în amplificarea pentru obținerea pSPS-Bgl1

Construcția vectorilor pSPS-Bgl1-D0 și pSPS-Bgl1-D1. Domeniul *fibronectin-like* (FLD) este situat la nivelul COOH-terminal al β -glucozidazei de la *Saccharomycopsis fibuligera* și este codificat de secvențe nucleotidice care determină conformații de tip β -sandwich la nivel proteic. Pornindu-se de la pSPS-Bgl1, pentru evidențierea rolului acestui domeniu proteic, s-a construit plasmidul pSPS-Bgl1-D0 (care a pierdut întreaga secvență nucleotidică codificatoare a domeniului *fibronectin-like*) și plasmidul pSPS-Bgl1-D1 (prin deleția parțială a secvențelor nucleotidice care codifică doar ultimele 6 conformații β -sandwich). În figura 5.13 este reprezentată direcția de amplificarea oligonucleotidelor primer în scopul eliminării totale (LG689/JM741) sau parțiale (JM737/JM741) a secvențelor acestui domeniu. Procesul de amplificarea este urmat de autoligarea vectorului cu T4 ADN ligaza (*Fermentas*).

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

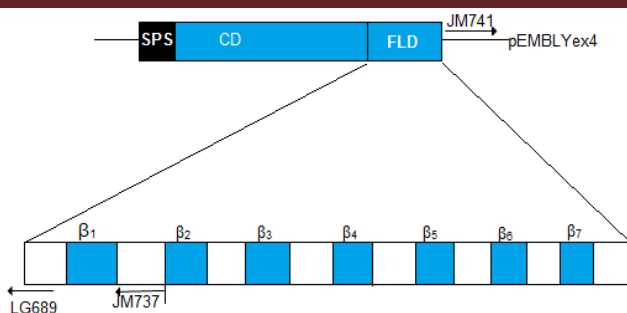


Figura 5.13. Reprezentarea structurală a locului de atașare a oligonucleotidelor-primer LG689, JM737 și JM741 la nivelul secvențelor nucleotidice FLD; (SPS-segment codicator al secvenței semnal din STA1; CD-segment codicator al domeniului catalitic al Bgl1; FLD- segment codicator al domeniului fibronectin-like)

Construcția vectorului plasmidial pSTA1-FLD. Pentru evidențierea posibilei implicări a domeniului fibronectin-like în adeziunea celulară s-a construit vectorul plasmidial de exprimare pSTA1-FLD. În acest scop s-a realizat amplificarea prin PCR a fragmentului nucleotidic codicator al domeniului FLD din genei *bgl1* cu oligonucleotidele JM703/JM700 (figura 5.15 A), restricția enzimatică cu *NotI/XbaI* și ligarea sa la gena STA1, de asemenea amplificată cu oligonucleotidele JM701/JM702 (figura 5.15 B) și supusă restricției enzimatice cu *NotI/SacI*.

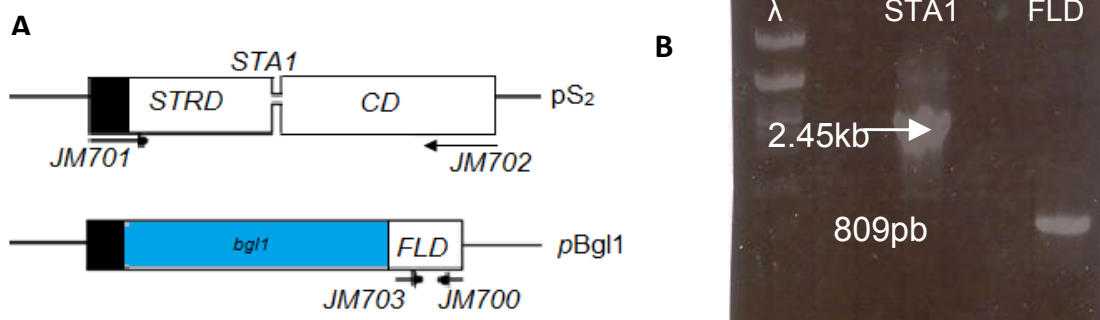


Figura 5.15. A. Direcția de amplificare a oligonucleotidelor JM701/JM702 și JM703/JM700. B. Migrarea în gel de agaroză 0.7% a produsilor amplificați

Verificarea ligării s-a realizat prin digestia enzimatică cu *PstI/HindIII* și *Safl/HindIII*. În figura 5.16 sunt localizate situsurile acestor endonucleaze de restricție în cadrul vectorului plasmidial pSTA1-FLD cât și lungimea fragmentelor formate după restricție.

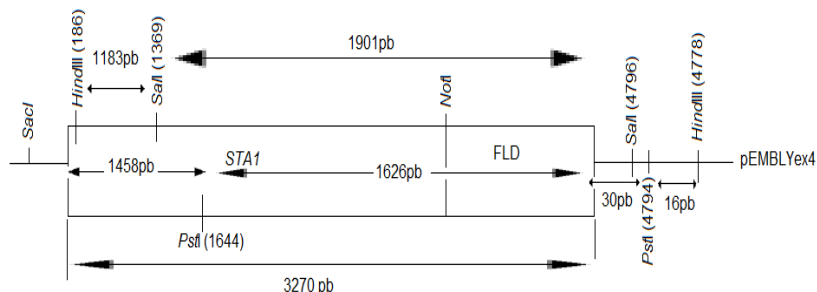


Figura 5.16. Reprezentarea schematică a situsurilor de restricție pentru principalele endonucleaze de la nivelul genei STA1 și pEMBLYex4

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Toate plasmidele recombinante construite au fost secvențiate cu scopul verificării apariției eventualelor mutații. Tulpina de laborator *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa his3 leu2 met15 ura3*) a fost transformată cu fiecare dintre plasmidele construite, iar noile denumiri date tulpinilor obținute sunt prezentate în tabelul 5.1.

Tabelul 5.1. Denumirile tulpinilor obținute prin transformare cu diferite plasmide

Specia	Tulpina transformată	Plasmidul utilizat	Denumirea tulpinii transformate
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741	<i>pST-Bgl1</i>	<i>Sc-pST-Bgl1</i>
		<i>pSPS-Bgl1</i>	<i>Sc-pSPS-Bgl1</i>
		<i>pBgl1</i>	<i>Sc-pBgl1</i>
		<i>pEMBL Yex4</i>	<i>Sc-pEMBL Yex4</i>
		<i>pSPS-Bgl1-D0</i>	<i>Sc- pSPS-Bgl1-D0</i>
		<i>pSPS-Bgl1-D1</i>	<i>Sc- pSPS-Bgl1-D1</i>
		<i>pSTA1-FLD</i>	<i>Sc-pSTA1-FLD</i>

Exprimarea segmentelor genice codificatoare a *ST-Bgl1*, *SPS-Bgl1* și *Bgl1* inserate în vectorul *pEMBL Yex4* a fost testată, inițial, prin creșterea transformanților pe mediu lichid YP cu 2% celbioză. Tulpina de laborator transformată cu vectorul plasmidial *pEMBL Yex4* a reprezentat tulpina control (proba martor). Din figura 5.19 se observă că, atât secvența semnal proprie β -glucozidazei cât și secvența semnal a glucoamilazei de la *S. cerevisiae* var. *diastaticus* au favorizat secreția β -glucozidazei, permițând astfel multiplicarea transformanților în mediu cu celbioză, comparativ cu tulpina transformată doar cu vectorul *pEMBL Yex4*, care nu conține nici o secvență codificatoare a genei *bgl1* și a cărei dezvoltare în acest mediu nu a fost posibilă.

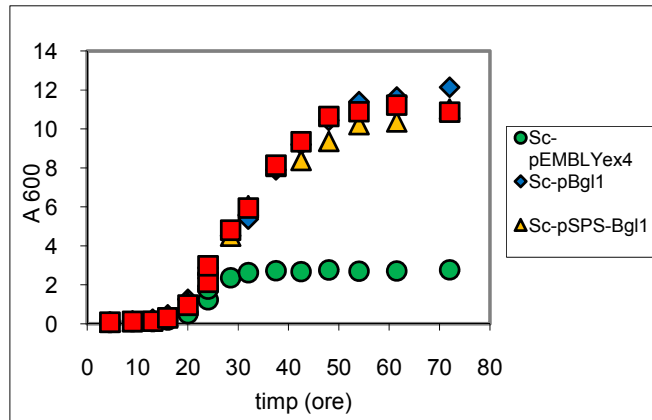


Figura 5.19. Curba de creștere a tulpinii *S. cerevisiae* BY4741 transformată cu *pEMBL Yex4* (control), *pBgl1*, *pSPS-Bgl1* și *pST-Bgl1* în mediu YP+2% celbioză

Concluzii

- S-au construit șase vectori plasmidiali de exprimare care conțin gene hibrid obținute prin interschimbul fragmentelor codificatoare ale domeniilor non-catalitice: fibronectin-like (FLD) al β -glucozidazei și domeniul serină-treonină (STRD) al glucoamilazei de la *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*.

- Prin exprimarea genelor hibrid STA1/bgl1 inserate în vectorul plasmidial de exprimare pEMBLYex4, care a fost ulterior utilizat pentru transformarea tulpinii de laborator *S. cerevisiae* BY4741, s-a creat posibilitatea acestei tulpini să crească pe mediu cu celobioză, caracteristică neevidențiată la tulpina parentală.

Capitolul 6

Analiza structurii β -glucozidazei produsă de *Saccharomycopsis fibuligera*. Modelul structural al β -glucozidazei (figura 6.1) izolată de la *Saccharomycopsis fibuligera* a fost obținut cu ajutorul programului I-TASSER (Roy și colab., 2010) folosind ca matriță modelul structural al β -glucozidazei de la *Thermotoga neapolitana*, descifrat de către Pozzo și colaboratorii în anul 2010. Structura prezisă de program este asemănătoare și altor enzime din cadrul familiei glucozid-hidrolazelor, evidențiindu-se astfel trei domenii: un domeniu amino-terminal (α/β)₈ (conformație α -helix, alături de conformație β pliată-ABB), un domeniu central cu o conformație α/β sandwich (ABS) și un domeniu carboxil-terminal cu structură β -sandwich. Situsul catalitic al enzimei se află localizat între primele două domenii, între acidul aspartic (Asp-D278) al domeniului ABB și acidul glutamic (Glu-E509) al domeniului ABS (figura 6.2).

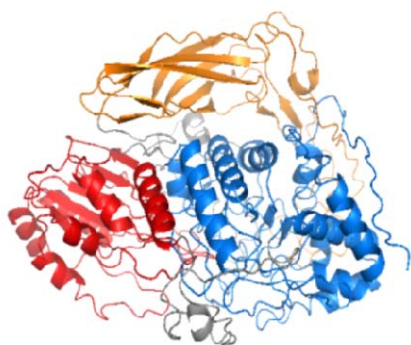


Figura 6.1.

Modelul structurii tridimensionale a β -glucozidazei de la *Saccharomycopsis fibuligera* elaborat de programul I-TASSER. Conformația ABB (albastru), conformația ABS (roșu) și conformația β -sandwich (oranj). Evidențierea situsului activ și a orientării resturilor catalitice, D278 și E509.

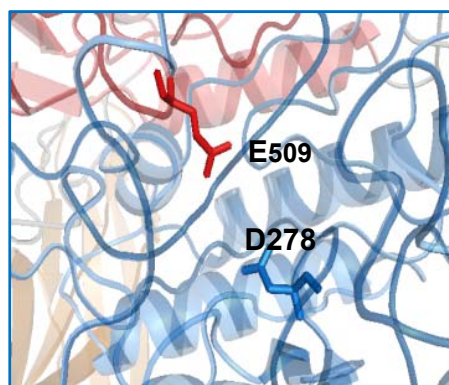


Figura 6.2.

În vederea obținerii mai multor informații referitoare la funcția domeniului carboxil-terminal s-a realizat o căutare extinsă a unor structuri înrudite cu domeniul β -sandwich al β -glucozidazei de la *Saccharomycopsis fibuligera*. Prin utilizarea programului PSIPRED (Bryson și colab., 2005) s-au evidențiat similarități în secvența de aminoacizi cu domeniile CARDB (*Cell-Adhesion Related Domains*) întâlnite la bacterii și cu modulele de legare ale glicogenului. Server-ul DALI (Holm și colab., 2008) a ilustrat cea mai înaltă similitudine structurală a domeniului β -sandwich cu domeniile carboxil-terminale prezente în proteine de tipul fibronectinei sau imunoglobulinelor, a căror funcție este de a lega anumiți carbohidrați, intermediind astfel mecanismele de recunoaștere a substraturilor și adeziunea celulară. Datorită acestor similarități structurale, domeniul de la nivelul capătului carboxil-terminal al β -glucozidazei de la *Saccharomycopsis fibuligera*, având conformația β -sandwich, a fost desemnat ca fiind domeniu *fibronectin-like* (FLD).

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂTĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Structura enzimelor recombinante Sta1-Bgl1. În secvența glucoamilazei izolată de la *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* se disting trei regiuni bine definite: o secvență semnal care asigură secreția proteinei în mediul de cultură, un domeniu bogat în serină și treonină la

capătul N-terminal (STRD) înrudit cu floculina întâlnită la drojdii și un domeniu COOH-terminal care prezintă structura tipică domeniului catalitic al oricărei glucoamilaze fungice (Adam și colab., 2004). Pentru a se testa dacă regiunea bogată în serină-treonină este implicată în secreție au fost construite diferite enzime chimerice prin fuziunea segmentului genic codificator al enzimei mature Bgl1, cu segmentul genic codificator al secvenței semnal Sta1 de la *S. cerevisiae* var. *diastaticus* cu sau fără STRD. De asemenea, pentru evaluarea funcției domeniului *fibronectin-like* a β -glucozidazei s-a realizat fuziunea, la nivel genic, a acestui domeniu la capătul C-terminal al glucoamilazei Sta1. În plus, au fost construite alte două enzime hibrid prin îndepărtarea totală sau parțială a domeniului FLD (figura 6.6).

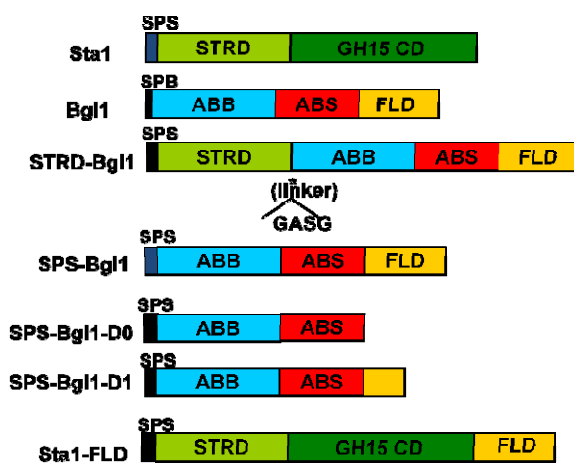


Figura 6.6. Reprezentarea topologică a enzimelor construite și analizate. Sta1-glucoamilaza de la *S. cerevisiae*; SPS-secvența semnal din Sta1; STRD-domeniul bogat în serină-treonină a glucoamilazei Sta1; GH15CD-domeniul catalitic al glucoamilazei Sta1 (familia 15 a glicozid-hidrolazelor); SPB-secvența semnal proprie β -glucozidazei; ABB-domeniul α/β barrel a Bgl1; ABS-domeniul α/β sandwich a Bgl1; FLD-domeniul fibronectin-like a Bgl1

Localizarea și activitatea enzimelor chimerice obținute. Tulpinile de drojdie recombinante, *Sc-pBgl1*, *Sc-pSPS-Bgl1*, *Sc-pST-Bgl1*, obținute prin transformarea tulpinii de laborator *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 cu vectori plasmidiali de secreție care conțin gena *bgl1* sau fragmentele genice recombinante STA1/*bgl1* (Capitolul 5), au fost crescute în mediu YPD iar secreția genică a fost indusă cu galactoză 0.5% spre finalul fazei logaritmice de creștere. Analiza activității β -glucozidazice, determinată prin utilizarea substratului *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranozid (*p*NPG), a evidențiat faptul că, transformanții *bgl1* au activitate β -glucozidazică extracelulară, iar 75% din aceasta s-a regăsit atașată de celulă, în timp ce restul a fost eliberată în mediul de cultură (figura 6.7). Această distribuție, 3:1, enzimă atașată:enzimă eliberată în mediul de cultură, este în acord cu funcția ipotetică a domeniului *fibronectin-like*, de adeziune celulară, dar și cu predicția dată de structura acestui domeniu. Pe de altă parte, înlocuirea secvenței semnal native a β -glucozidazei cu cea a glucoamilazei (SPS-Bgl1) determină creșterea producției enzimatice de aproximativ trei ori, dar fără a fi afectat raportul dintre activitatea enzimatică de la nivelul celulei și activitatea enzimatică evidențiată în mediul de cultură (figura 6.7).

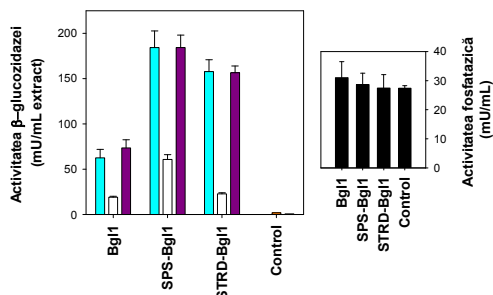


Figura 6.7. Activitatea β -glucozidazei produsă de transformanții *Sc-pBgl1*, *Sc-pSPS-Bgl1*, *Sc-pST-Bgl1* și *Sc-pEMBLYex4* (control) în celulele intacte (cian), în mediile de cultură (alb), în extractele celulare (mov). Activitatea fosfatazei alcaline măsurată în extracte (negru)

Prin îndepărtarea totală sau parțială a fragmentului nucleotidic codificator al domeniului *fibronectin-like* (FLD) și transformarea tulpinii *S. cerevisiae* BY4741 cu plasmidele *pSPS-Bgl1-D0* și *pSPS-Bgl1-D1* urmată de inducerea exprimării genice, activitatea β -glucozidazică nu a mai putut fi detectată. Probabil că, prin eliminarea totală sau parțială a domeniului *fibronectin-like* are loc destabilizarea structurală a β -glucozidazei, explicându-se astfel absența activității enzimatice în tulpinile *Sc-pSPS-Bgl1-D0* și *Sc-pSPS-Bgl1-D1* (figura 6.8).

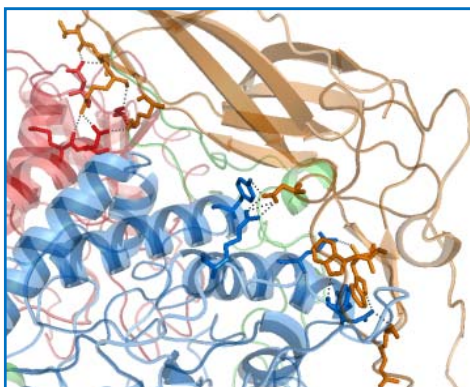


Figura 6.8. Imaginea structurii tridimensionale a β -glucozidazei de la *Saccharomycopsis fibuligera* cu evidențierea legăturilor polare dintre anumiți aminoacizi ai domeniului *fibronectin-like* (oranj) și aminoacizi ai domeniul ABB (albastru) sau dintre aminoacizi ai domeniului *fibronectin-like* și aminoacizi ai domeniul ABS (roșu)

Pentru evidențierii rolului domeniului *fibronectin-like* în adeziunea celulară, tulpina *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 a fost transformată cu vectorul plasmidial *pSTA1-FLD*. În figura 6.9 se poate observa că, aproximativ 75% din activitatea glucoamilazică a transformanților *Sc-pSta1-FLD* a fost detectată la nivelul peretelui celular, comparativ cu activitatea glucoamilazică a transformanților *Sc-pSta1*, evidențiată în mare parte (aprox. 65%) în mediul de cultură. Acest rezultat confirmă rolul domeniului FLD în adeziunea celulară.

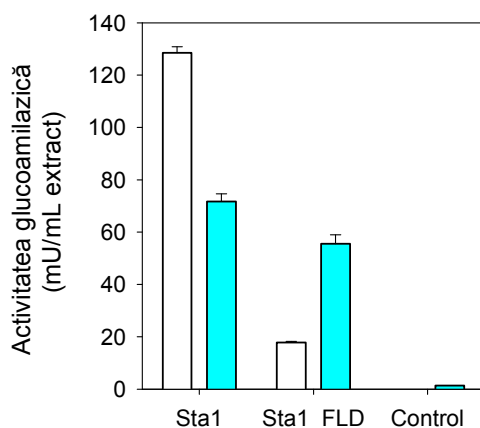


Figura 6.9. Activitatea glucoamilazică produsă de tulpinile *S. cerevisiae* BY4741 hibrid capabile să exprime gena *STA1* sau gena codificatoare a enzimei heteroloage care conține FLD atașat la capătul C-terminal a *Sta1* (*Sta1-FLD*). Activitatea glucoamilazică a fost testată atât în mediul de cultură (alb) cât și la nivelul celulelor după tratament cu zimoliază (cian)

Mărimile proteinelor heteroloage și glicozilarea. Tulpinile obținute prin transformarea drojdiei *S. cerevisiae* BY4741 cu *pBgl1*, *pSPS-Bgl1*, *pST-Bgl1*, *pSTA1-FLD* și *pSTA1* au fost cultivate în mediu YPD cu galactoză 0.5% până în faza staționară de creștere. Supernatantul a fost colectat, liofilizat și concentrat, iar enzimele existente în supernatant au fost supuse deglicozilării prin tratament cu EndoH, analizate în gel de electroforeză SDS-PAGE și colorate prin Coomassie. Proba concentrată din mediul de cultură al transformanților induși cu galactoză a fost incubată cu (+) sau fără (-) EndoH, timp de 16 ore la temperatura de 37°C (figura 6.10). Tulpina control este reprezentată de tulpina de laborator transformată cu *pEMBLYex4*. Proteinele heteroloage au fost identificate în gelul proteic ca benzi diferențiale prin comparație cu *pattern*-ul proteic al tulpinii control, care nu prezintă nici una din genele recombinante (figura 6.10).

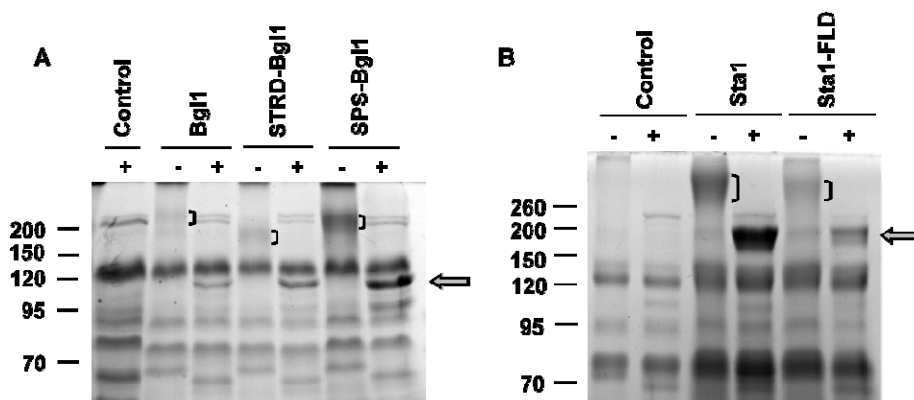


Figura 6.10. *Pattern*-ul electroforetic al proteinelor secretate de transformanții capabili să exprime gena *bgl1* de la *Saccharomycopsis fibuligera*, gena *STA1* de la *Saccharomyces cerevisiae* sau genele codificatoare ale proteinelor chimerice *SPS-Bgl1*, *STRD-Bgl1*, *Sta1-FLD*. Săgețile indică probele tratate cu EndoH iar parantezele pătrate indică probele netratate cu EndoH

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂTĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Masa moleculară a proteinelor denaturate prin tratament cu EndoH, calculată experimental, a fost asemănătoare cu masa moleculară teoretică pentru proteinele Bgl1, SPS-Bgl1 și STRD-Bgl1 secretate de transformanți (tabelul 6.1). Valorile obținute au indicat că, după digestia cu endoglicozidaza H, deglicozilarea proteinelor STRD-Bgl1 și Bgl1 s-a realizat aproape complet.

Tabelul 6.1. Analiza mărimilor (kDa) proteinelor heteroloage recuperate din mediul de cultură YPD cu galactoză, după digestia cu endoglicozidază H

Proteina	Masa moleculară a proteinei denaturate	Masa moleculară a proteinei native	Masa moleculară teoretică
Bgl1	110 kDa	-	95 kDa
SPS-Bgl1	110 kDa	130 kDa	95 kDa
STRD-Bgl1	110 kDa	130 kDa	128 kDa
Sta1	200 kDa	230 kDa	85 kDa
Sta1-FLD	200 kDa	230 kDa	115 kDa

Pe de altă parte, valorile obținute pentru masele moleculare ale proteinelor heteroloage prin cromatografia de excludere moleculară (figura 6.13; figura 6.14) s-au dovedit a fi similare cu cele determinate din gelul proteic SDS-PAGE, indicând astfel existența acestor proteine într-o formă monomerică. Prin combinarea domeniului catalitic cu cele non-catalitice (STRD, FLD), se observă o oarecare reducere a glicozilării. Acest aspect a fost evidențiat printr-o migrare mai rapidă (o mobilitate mai mare) a proteinei STRD-Bgl1 comparativ cu Bgl1, în probele netratate cu endoglicozidază H.

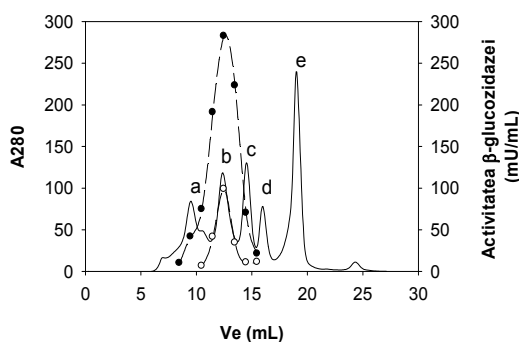


Figura 6.13

Figura 6.13. Cromatograma proteinelor secretate de către tulpinile transformate cu genele codificatoare ale proteinelor chimerice SPS-Bgl1, STRD-Bgl1. Activitatea β-glucozidazei din fracțiile proteice secretate de transformanții SPS-Bgl1 (cercurile pline) și de STRD-Bgl1 (cercurile goale).

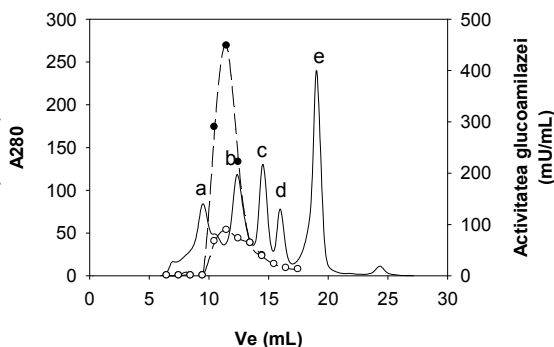


Figura 6.14

Figura 6.14. Cromatograma proteinelor secretate de către tulpinile transformate cu gena STA1 sau cu fragmentul genic recombinat Sta1-FLD. Activitatea glucoamilazei din fracțiile proteice ale transformanților Sta1 (cercurile pline) și ale Sta1-FLD (cercurile goale). Linia continuă indică profilul de eluție al standardului Gel-Filtration (Bio-Rad).

Rezultatele obținute evidențiază secvența semnal a glucoamilazei ca fiind o alternativă promițătoare pentru inducerea secreției proteinelor heteroloage la drojzii, idee susținută și de Nam și colaboratorii care au raportat eficientizarea secreției lipocortinei umane, odată cu

utilizarea secvenței semnal de la Sta1 (Nam și colab., 1994). Ipotezele implicării domeniului STRD din Sta1 în complementarea secreției sau în legarea substratului nu pot fi acceptate, oricum cea din urmă ipoteză a fost înlăturată prin rezultate anterior publicate, de către Adam și colaboratorii (2004). Structura modulară a genelor STA de la *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus* a rezultat în urma unor procese de recombinare realizate între secvența codificatoare a capătului amino-terminal a *FLO11/MUC11* (incluzând secvența semnal), care a atins și STRD, și secvența codificatoare a glucoamilazei intracelulare, *SGA*, care a determinat domeniul catalitic al genelor STA (Lo și Dranginis, 1996). Rolul care poate fi acordat domeniului STRD este înrudit cu acela al proteinei Flo11 din care a evoluat. Într-adevăr, tulpinile de drojdii care au activitate amilolitică (Sta1) au și capacitatea de a flocula (Lo și Dranginis, 1996). Prin urmare, glucoamilaza Sta1 poate fi considerată o proteină bifuncțională care conferă drojdiei secretoare avantaje selective rezultate din cele două funcții neînrudite și anume, funcția de floclulare și funcția de a hidroliza amidonul. În ceea ce privește funcția domeniului *fibronectin-like* se consideră că, acest domeniu este implicat în adeziunea celulară, funcție acordată în baza omologiei structurale și de către Pozzo și colaboratorii (2010). Rezultate obținute în urma experimentelor prezentate anterior au arătat că, atât Bgl1 cât și Sta1-FLD au tendința de a rămâne atașate de peretele celular, venind astfel în sprijinul ipotezei propuse și de Pozzo în 2010. Semnificația biologică a acestei proprietăți a β -glucozidazei este de a crește concentrația produsului de reacție (glucoza) în imediata apropiere a suprafeței celulare, favorizând astfel pătrunderea rapidă a glucidului în celulă. Prezența acestui domeniu oferă o perspectivă către manipulări adiționale ale enzimei. De exemplu, utilizarea sa în procesele de imobilizare proteică pe suport solid prin legături covalente fără a fi afectată funcția enzimatică. Distribuția enzimei între suprafața celulei și mediul de cultură poate depinde de compoziția peretelui celular și, implicit de tulpina de drojdie sau de condițiile de creștere.

Concluzii

- S-au construit și analizat enzime hibrid prin interschimbul domeniilor catalitice și non-catalitice ale glucoamilazei de la *S. cerevisiae var. diastaticus* și β -glucozidaza de la *Saccharomycopsis fibuligera*.
- Prin intermediul programului I-TASSER s-a obținut modelul structural al β -glucozidazei izolată de la *Saccharomycopsis fibuligera* având ca template modelul structural al β -glucozidazei de la *Thermotoga neapolitana*.
- Transformanții *Sc-pSPS-Bgl1-D0* și *Sc-pSPS-Bgl1-D1* nu manifestă activitate β -glucozidazică marcându-se astfel rolul pe care îl are domeniul *fibronectin-like* în stabilitatea structurii proteice.
- Prin transformarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae BY4741* cu vectori plasmidiali de secreție care conțin gena *bgl1* sau fragmentele genice recombinare STA1/*bgl1* au rezultat transformanți cu activitate β -glucozidazică, activitate verificată pe substratul *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranozid.
- Prin compararea maselor moleculare ale proteinelor chimerice după purificarea prin cromatografia de excludere moleculară cu cele obținute în urma migrării gelului proteic SDS-PAGE s-a concluzionat că, aceste proteine se găsesc sub formă de monomeri și sunt glicozilate.

Capitolul 7

Producția de bioetanol din material vegetal sau lignocelulozic a devenit o mare provocare pentru biotehnologie. Conversia biomasei vegetale în etanol implică hidroliza enzimatică a biomasei celulozice până la glucide reducătoare pentru ca ulterior, acestea să fie transformate în etanol. Această transformare este costisitoare din cauza producției scăzute de etanol cât și din cauza costurilor ridicate. Astfel, cu obiectivul de a obține tulpini de drojdii industriale din genul *Saccharomyces* capabile să utilizeze celobioza, a fost clonat fragmentul genic SPS-Bgl1 din *pSPS-Bgl1* în:

- vectorul plasmidial *pKS₂* (Garcia și colab., 2005), sub influența unui promotor inductibil, rezultând plasmidul *pGal-SPS-Bgl1-3003* și
- în vectorul plasmidial *p3003*, sub influența unui promotor constitutiv, rezultând *pAct-SPS-Bgl1-3003*.

Ulterior, tulpinilor de drojdii industriale transformate cu aceste plasmide li s-au testat activitatea β-glucozidazică utilizând ca substrat *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranozid (capitolul Materiale și metode).

Construcția și analiza vectorului plasmidial de exprimare *pGal-SPS-Bgl1-3003*. Pentru obținerea plasmidului *pGal-SPS-Bgl1-3003* s-a realizat simultan digestia enzimatică cu endonucleaza *SphI* atât a vectorului plasmidial *pKS₂* (Materiale și metode, figura 4.4) cât și a plasmidului *pSPS-Bgl1* (figura 7.1).

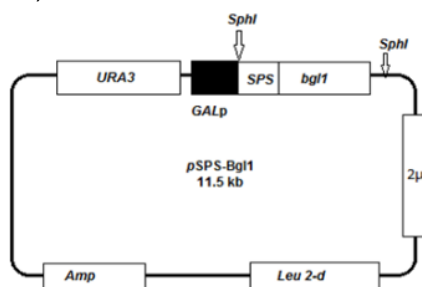


Figura 7.1. Reprezentarea schematică a situsului de acțiune a endonucleazei de restricție *SphI* în cadrul plasmidului *pSPS-Bgl1* în scopul eliberării fragmentului genic *SPS-Bgl1*

Fragmentele rezultate în urma restricției *p3003* și *SPS-Bgl1* au fost separate în gel de agaroză 0.7%. Ligarea fragmentelor s-a realizat cu enzima T4 ADN ligaza. După obținerea coloniilor bacteriene transformate s-au ales aleatoriu 12 colonii din care s-a realizat izolarea ADN-ului plasmidial. Pentru verificarea inserării corecte a fragmentului *SPB-Bgl1* în *p3003*, cele 12 fragmente de ADN plasmidiale recombinante izolate au fost supuse digestiei cu endonucleazele *SalI/SacI*. Utilizând programul DNAMAN40 și cunoscând secvența nucleotidică atât a plasmidului *p3003*, cât și a genei *SPS-Bgl1*, a fost posibilă localizarea cu exactitate a situsurilor de restricție pentru endonucleazele utilizate și calcularea lungimii fragmentelor de ADN plasmidice formate după restricție. Conform acestei predicții, *SacI* taie în cadrul fragmentului genic *SPS-Bgl1* la nivelul 145 pb, iar în vectorul *p3003* la nivelul 282 pb. De asemenea, endonucleaza *SalI* acționează la nivelul 31 pb în vectorul plasmidial *p3003*. Astfel, acțiunea sinergică a celor două enzime ar trebui să determine (dacă inserția *SPS-Bgl1* s-a realizat corect în *p3003*), eliberarea a trei fragmente de ADN plasmidic, cu următoarele dimensiuni: I. 2535 pb, II. 2561 pb și III. 5241 pb (figura 7.2).

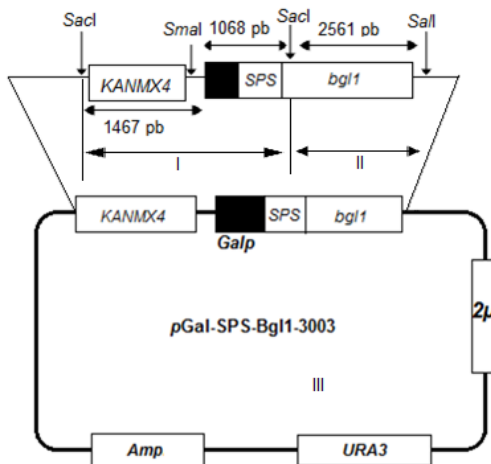


Figura 7.2. Reprezentarea schematică a vectorului plasmidial pGal-SPS-Bgl1-3003 și a situsurilor de restricție ale endonucleazelor SacI/SalI

În figura 7.5 se evidențiază separarea benzilor de ADN plasmidial obținute prin acțiunea enzimelor de restricție *PstI/XhoI* și *SphI*. Migrarea acestora în gel de agaroză 0.7% a permis stabilirea dimensiunilor lor prin comparație cu benzile markerului λ /*PstI* (Fermentas). Confirmarea inserției genei hibrid SPS-Bgl1 în aval față de promotorul CYCGAL din plasmidul p3003 a fost valabilă doar pentru ADN-ul plasmidial izolat din coloniile bacteriene din pozițiile 5 și 9 ale gelului de agaroză (figura 7.5).

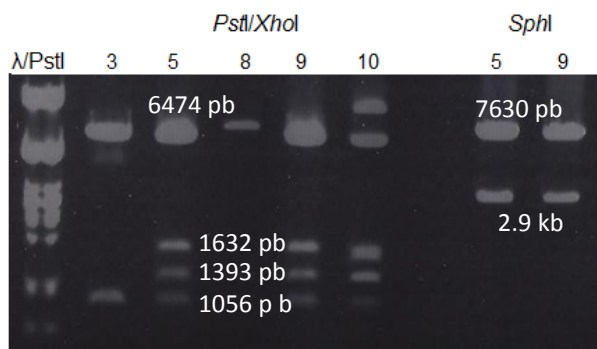


Figura 7.5. Fragmente de ADN plasmidial ale coloniilor 3, 5, 8, 9 și 10, separate prin electroforeză în gel de agaroză 0.7% după digestia enzimatică cu endonucleazele de restricție *PstI/XhoI* și ale coloniilor 5 și 9 după digestia enzimatică cu *SphI*

Exprimarea genei hibrid SPS-Bgl1 în tulpini de drojdii industriale sub controlul transcripțional al promotorului inductibil CYCGAL. Transformarea celobiozei în etanol se poate realiza eficient cu ajutorul tulpinilor de drojdii care prezintă o bună capacitate fermentativă și totodată sunt bune producătoare de β -glucozidază (celobiază). În tabelul 7.2 se regăsesc noile coduri date tulpinilor de drojdii industriale obținute prin transformare cu pGal-SPS-Bgl1-3003 precum și eficiența procesului de transformare pentru fiecare tulpină în parte.

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Tabelul 7.2. Eficiența transformării tulpinilor de drojdii industriale cu pGal-SPS-Bgl1-3003 comparativ cu tulpina de laborator BY4741

Specia	Tulpina transformată	Denumirea tulpinii transformate	Eficiența transformării ufc/μg ADN
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741	<i>Sc-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	7.7
	FJF135	<i>Sc135-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	0.4
	FJF305	<i>Sc305-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	0.6
	Y370	<i>Sc370-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	5.0
	S491	<i>Sc491-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	1.7
	S499	<i>Sc499-pAct-SPS-Bgl1-3003</i>	2.0
	NYCY 512	<i>Sp512-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	1.5
	NYCY 519	<i>Sp519-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	0.7
<i>S. bayanus</i>	NYCY 1324	<i>Sb1324-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	1.2
<i>S. boulardii</i>	Y111	<i>S111-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	0.2
<i>S. unisporus</i>	HY48	<i>Su48-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	16.0
<i>S. carlsbergensis</i>	Y 28	<i>Scarl28-pGal-SPS-Bgl1-3003</i>	0.7

Activitatea β -glucozidazei a fost determinată după 24, 48 și respectiv 72 de ore folosindu-se ca substrat *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranozid (*p*NPG). Metoda de detectare a activității β -glucozidazei în tulpinile transformate s-a bazat pe proprietatea acestei enzime de a hidroliza substratul glucozidic reprezentat de *p*NPG. Probele s-au realizat în trei exemplare, iar tulpinile parentale ale fiecărui transformant în parte au constituit probe martor. Activitatea enzimatică s-a determinat atât la nivel celular cât și în mediul de cultură al transformanților și s-a evidențiat faptul că, toți transformanții testați au exprimat gena *bgl1*, fiind capabili să hidrolizeze substratul glucozidic, comparativ cu tulpinile parentale a căror activitate enzimatică a fost nulă. Absența activității enzimatice în tulpinile parentale, martor este în acord cu datele existente în literatura de specialitate, iar explicația este aceea că, în genomul drojdiilor din genul *Saccharomyces* nu există gene care să codifice β -glucozidaza (EC 3.2.1.21) (Cherry și colab., 1997; <http://www.yeastgenome.org>; 2 ianuarie 2007).

În cazul tulpinilor transformate se observă, în general, o creștere a activității enzimatice totale de la 24 de ore la 72 de ore, cu o distribuție preponderentă la nivelul peretelui celular, comparativ cu aceea din mediul de cultură. În figurile 7.6, 7.8 și 7.10 este reprezentată activitatea enzimatică de la nivelul peretelui celular în cazul celor 12 tulpini de drojdii transformate cu *pGal-SPS-Bgl1-3003*, după 24 de ore, 48 de ore și respectiv 72 de ore de cultivare în mediu YPD cu galactoză 0.5% ca inductor și geneticină (G418) 50 mg/L, ca marker de selecție a transformanților. După 24 de ore de la inducție, cantitatea de enzimă activă exprimată de tulpinile transformate *Sc491* și *Su48*, alături de cea exprimată de drojdia de laborator *Sc*, s-a considerat a fi net superioară celorlalte tulpini transformate (figura 7.6, figura 7.7). Pe de altă parte, pentru tulpinile *Sc135* și *Sc499* nu s-a observat activitate β -glucozidazică nici la nivelul peretelui celular și nici în mediul de cultură analizat în probele colectate la 24 de ore de la inducție (figura 7.6, figura 7.7).

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

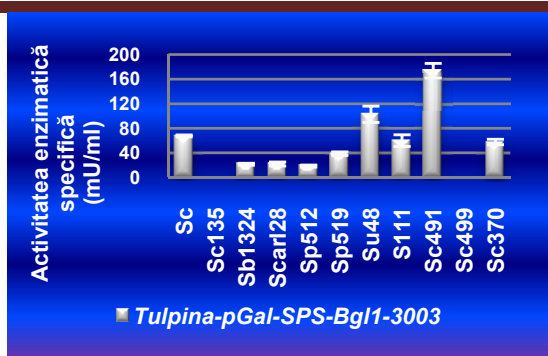


Figura 7.6

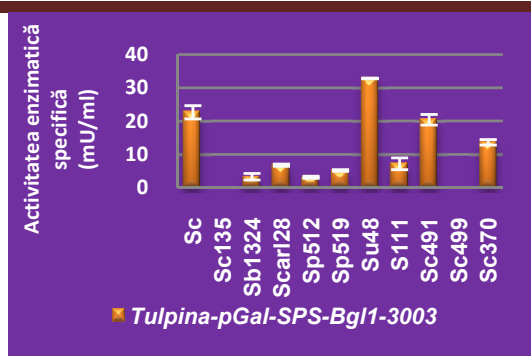


Figura 7.7

Activitatea β -glucozidazei asociată peretelui celular (figura 7.6) și din mediul de cultură (figura 7.7) al tulpinilor transformate cu pGal-SPS-Bgl1-3003, la 24 de ore de la cultivare

Analiza probelor colectate la 48 de ore de la inducție a evidențiat o creștere semnificativă a activității enzimatice exprimată de *Su48*, *Sc491*, *Sc370* și *Sc* atât la nivelul peretelui celular, cât și în mediul de cultură. Comparând rezultatele activității enzimatice obținute la 48 de ore cu cele de la 24 de ore, pentru tulpina *Su48*, se poate afirma că, activitatea acesteia s-a dublat, atingând valoarea de 260 mU/mL (de la 136 mU/mL) în doar 24 de ore. În cazul tulpinilor *Sb1324*, *Scarl28*, *Sp519* și *S111* nu s-a constatat o creștere a activității enzimatice totale de la 24 de ore la 48 de ore, în schimb, se observă o eliberare în mediul de cultură a unui anumit procent (4.3% pentru *Sb1324*, 9.06% pentru *Scarl28*, 1.7% pentru *Sp519* și 2.34% pentru *S111*) al β -glucozidazei hibrid, de la nivelul peretelui celular în mediul de cultură. Testarea activității enzimatice specifice a tulpinilor hibrid la 72 de ore de la realizarea inducției a evidențiat o continuare a creșterii acesteia față de 48 de ore, în cazurile: *Su48*, *Sc491*, *Sc*, *Sc135*, *Sc499*, *Sc135* și *Sb1324*. Comparativ cu evoluția activității β -glucozidazice exprimată de *Su48*, tulpinile *Sp512*, *Sp519* și *Sc370* nu eliberează o cantitate mai mare de enzimă heteroloagă capabilă să hidrolizeze substratul specific, în intervalul 48 de ore - 72 de ore de la cultivare. Disponibilitatea β -glucozidazei la nivelul peretelui celular are o importanță deosebită din punct de vedere biotehnologic deoarece conferă drojdiei capacitatea de a degrada și utiliza eficient celobioza. În tabelul 7.3 sunt prezentate procentele de enzimă activă asociată peretelui celular al tulpinilor de drojdie transformate cu pGal-SPS-Bgl1-3003 la 24, 48 și 72 de ore de cultivare în mediu cu galactoză.

Tabelul 7.3. Procentul de enzimă activă de la nivelul peretelui celular

Tulpina transformată cu pGal-SPS-Bgl1-3003	% activitate enzimatică după		
	24 de ore*	48 de ore*	72 de ore*
<i>Su48</i> (drojdie de kefir)	75,8%	69,6%	73,0%
<i>Sc</i> (drojdie de laborator)	75,0%	72,0%	73,0%
<i>S111</i> (tulpină probiotică)	89,33%	87,0%	85,8%
<i>Sc370</i> (drojdie de panificație)	80,9%	81,8%	75,3%
<i>Sp519</i> (drojdie de bere)	88,2%	80,0%	74,7%
<i>Sp512</i> (drojdie de bere)	85,7%	79,3%	72,0%
<i>Scarl 28</i> (drojdie de bere)	76,6%	67,4%	62,5%

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Sb1324 (drojdie de vin)	86,8%	82,5%	78,7%
Sc135 (drojdie de vin)	-	29,0%	61,7%
Sc491	89,5%	86,2%	84,1%
Sc499 (<i>petite</i>)	-	74,6%	69,8%

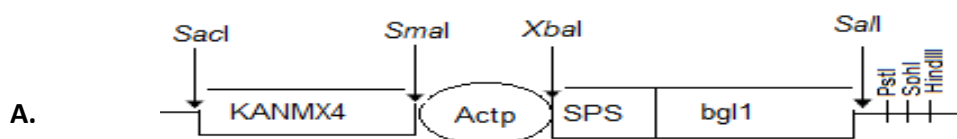
Stabilirea acestor sisteme capabile să permită dispunerea proteinelor heteroloage pe suprafața celulară a microorganismelor prezintă importanță deosebită în obținerea biocatalizatorilor microbieni sau în obținerea vaccinurilor. Producția enzimatică depinde în mod direct de capacitatea intrinsecă a fiecărei tulpini în parte, dar și indirect de factori extrinseci precum biomasa celulară.

Construcția și analiza vectorului de exprimare *pAct-SPS-Bgl1-3003*. Din punct de vedere biotehnologic, înlocuirea promotorului inductibil, *CYCGAL10*, cu promotorul constitutiv *Actp*, în vectorul de exprimare *p3003*, poate oferi câteva avantaje:

- intensificarea transcrierii ceea ce va avea drept consecință o producție enzimatică ridicată,
- sinteza enzimei în absența unui inductor scump, cerință obligatorie în cazul promotorului inductibil,
- posibilitatea utilizării la nivel industrial a tulpinilor transformate cu vectorul de exprimare, ceea ce va permite exprimarea constitutivă a genei heteroloage SPS-Bgl1 clonate.

Construcția vectorului plasmidial *p3003-Actp*. Plasmidul *p3003* are la bază vectorul epizomal YEplac195. În *p3003*, situsurile *SacI/SmaI* din MCS (Situs de Clonare Multiplu) flanchează gena de rezistență la kanamicină. Pentru obținerea *p3003-Actp* a fost inserat în *p3003* promotorul constitutiv (*Actp*) la nivelul *SmaI/XbaI*.

Inserarea genei heteroloage, SPS-Bgl1, în vectorul de exprimare *p3003-Actp*. Pentru exprimarea constitutivă a genei SPS-Bgl1 trebuie ca promotorul, *Actp* să fie situat înaintea acestei secvențe codificatoare. Având în vedere harta genetică a vectorului YEplac195 și faptul că *Actp* a fost inserat la nivelul *SmaI/XbaI*, singura posibilitate pentru ca secvența codificatoare a genei pentru β -glucozidază, cu secvența semnal din gena *STA1* să fie exprimată, o reprezintă inserarea acesteia la nivelul *XbaI/SalI*. În acest scop, s-a realizat amplificarea, prin PCR a fragmentului genic SPS-Bgl1 (2676 pb) din vectorul *pSPS-Bgl1* cu oligonucleotidele JM697/JM698. Acestea au fost construite în așa fel încât să conțină situsurile pentru endonucleazele de restricție *XbaI/SalI*. ADN-ul plasmidial recombinat a fost purificat cu ajutorul kitului *Marligen* și reanalizat prin alte digestii enzimatiche și anume, cu *SalI* și *XbaI* (figura 7.18).



STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

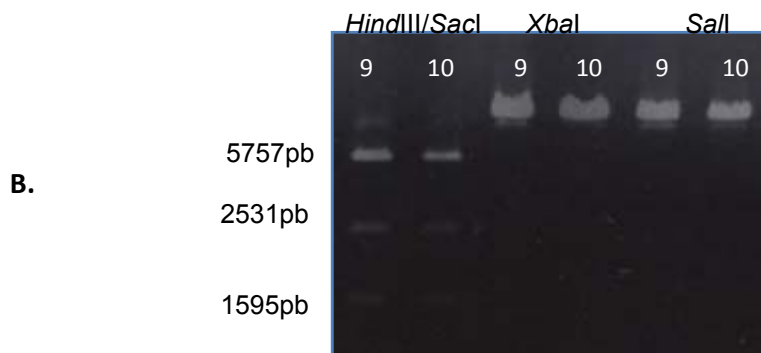


Figura 7.18. A. Reprezentarea schematică a situsurilor de acțiune ale endonucleazelor utilizate. B. Gelul de agaroză 0.7% cu benzile ADN-ului plasmidial supus restricției cu HindIII/SacI, XbaI și Sall.

Obținerea vectorului plasmidial de exprimare cu promotor constitutiv, *pAct-SPS-Bgl1-3003*, a constituit un punct forte în atingerea obiectivului: "exprimarea genei codificatoare a enzimei heteroloage, selectată ca având cea mai bună activitate, în diferite tulpini de drojdii industriale".

Exprimarea genei SPS-Bgl1 în tulpini de drojdii industriale sub controlul transcripțional al promotorului constitutiv, Actp. Obținerea tulpinilor de drojdii industriale transformate cu *pAct-SPS-Bgl1-3003*, s-a realizat cu o eficiență scăzută comparativ cu tulpina de laborator *S. cerevisiae* BY4741 (tabelul 7.5), dar mult mai eficient dacă se ia în calcul transformarea aceluiași tulpini cu vectorul *pGal-SPS-Bgl1-3003*. Pentru a evidențierea nivelului de exprimare al genei codificatoare a β -glucozidazei sub influența promotorului constitutiv s-a testat activitatea enzimatică a tulpinilor transformate pe același substrat, *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranozid (*pNPG*), care a fost utilizat anterior în cazul tulpinilor transformate cu vectorul plasmidial de exprimare ce conținea promotorul inductibil *CYCGAL10p*.

Condițiile de lucru au fost identice, s-a urmat același protocol, inclusiv colectarea probelor care s-a realizat la 24 de ore, 48 de ore și respectiv 72 de ore de la inițierea culturii în mediu YPD cu geneticină 50 mg/L. S-au realizat câte 3 determinări pentru a exprima activitatea enzimatică atât din mediul de cultură cât și de la nivelul peretelui celular al transformanților. La 24 de ore de la cultivare, exprimarea genei codificatoare a β -glucozidazei heteroloage determină la nivel periplasmic, activități enzimatică cu valori cuprinse între: 90-105 U/mL pentru tulpinile *Sc491* și *Sc*; 40-80 mU/mL pentru tulpinile *Sp519*, *Sp1324*, *Sc370*, *Sc499*, *Sc305*, *S111*, *Su48* și 9-20 mU/mL pentru *Sc135*, *Scarl28*, *Sp512*.

Nivelul activității enzimatică a continuat să crească și la 48 de ore de la inițierea culturii, atingând valori cuprinse între 100-145 mU/ml pentru tulpina probiotică (*S111*), drojdia (*Sc491*), drojdia de kefir (*Su48*), tulpina de laborator (*Sc*) și între 70-95 mU/mL pentru drojdia de panificație (*Sc370*), drojdiile de vin (*Sb1324*, *Sc305*) și drojdia de bere (*Sp519*).

Enzima rezultată prin *shuffling* între domeniul glucoamilazic de la *S. cerevisiae* var. *diastaticus* și β -glucozidaza de la *Saccharomycopsis fibuligera*, manifestă la nivelul peretelui celular după 72 de ore de la cultivare, în mediu YPD cu geneticină, valori cuprinse între 100 și 210 mU/mL pentru aproximativ 70% dintre tulpinile de drojdii (*Sc491*, *S111*, *Sc*, *Su48*, *Sc305*, *Sp519*, *Sb1324*, *Sc370*) transformate cu vectorul de exprimare *pAct-SPS-Bgl1-3003*. În cazul tulpinilor transformate cu plasmidul, *pGal-SPS-Bgl1-3003*, ce conține promotor inductibil, activitatea enzimatică periplasmică la 72 de ore de la inducție avea valori cuprinse între 100 și 210 mU/mL doar pentru 18% dintre tulpinile analizate (*Su48* și *Sc491*), restul tulpinilor având o activitatea enzimatică sub 80 mU/mL.

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Înlocuirea promotorului inductibil cu promotorul constitutiv favorizează exprimarea genei recombinante la un nivel mult mai înalt, element dovedit prin creșterea activității hidrolitice a enzimei hibrid și în mediul de cultură nu numai în regiunea periplasmică.

În figurile 7.22 și 7.23 se observă evoluția activității β -glucozidazei hibrid din mediul de cultură al tulpinilor de drojzii transformate cu $pAct$ -SPS-Bgl1-3003 și respectiv cu $pGal$ -SPS-Bgl1-3003, de la 24 de ore la 72 de ore.

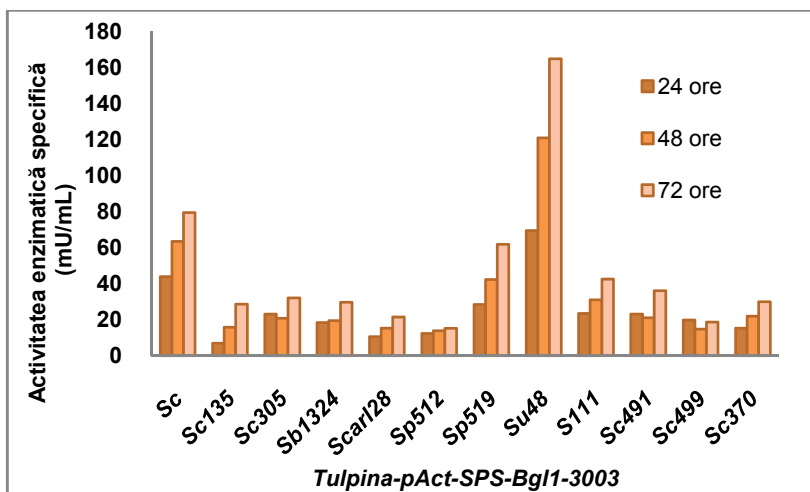


Figura 7.22. Activitatea β -glucozidazei din mediul de cultură al tulpinilor transformate cu $pAct$ -SPS-Bgl1-3003 pe durata a 72 de ore de cultivare

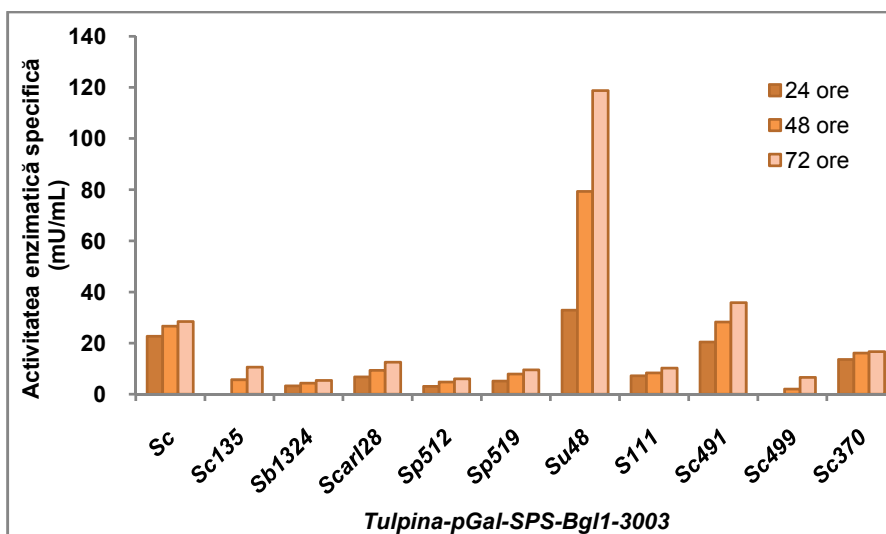


Figura 7.23. Activitatea β -glucozidazei din mediul de cultură al tulpinilor transformate cu $pGal$ -SPS-Bgl1-3003 pe durata a 72 de ore de cultivare

Însumând activitatea enzimatică de la nivelul peretelui celular cu cea exprimată în mediul de cultură și reprezentând-o grafic (figura 7.24), se poate afirma că, inserarea promotorului constitutiv în vectorul de exprimare YEPlac195 a determinat dublarea activității (pentru Sc, Scarl28, Sp512, Sc370), triplarea acesteia (pentru Sc135, S111, Sc499) sau chiar o mărire de 5x

a activității (pentru *Sb1324* și *Sp519*). Mai mult decât atât, drojdia de vin *Sc305*, prin transformarea cu plasmidul care favorizează exprimarea constitutivă a genei heteroloage SPS-Bgl1, a evidențiat capacitate hidrolitică (figura 7.23) atunci când s-a utilizat ca substrat *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranozid.

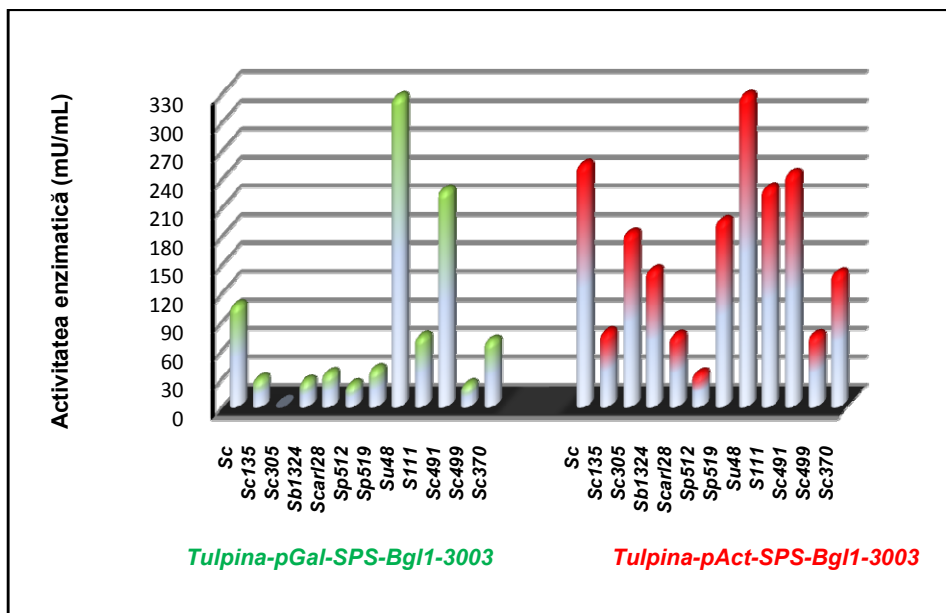


Figura 7.24. Activitatea enzimatică totală exprimată de tulpinile de drojdii transformate cu *pGal-SPS-Bgl1-3003* și respectiv cu *pAct-SPS-Bgl1-3003*, la 72 ore de la cultivare

Concluzii

- Fragmentul genic SPS-Bgl1, care conține gena codificatoare a β -glucozidazei și secvența semnal a glucoamilazei, a fost inserat în vectorul *pKS₂*, la nivelul *SphI*, și exprimat în 11 tulpini de drojdii industriale și în tulpina de laborator *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.
- Prin testarea activității β -glucozidazice a tulpinilor de drojdie transformate cu *pGal-SPS-Bgl1-3003*, la 72 de ore de la cultivare, au putut fi evidențiate tulpini cu activitate înaltă (*Su48* și *Sc491*), tulpini cu activitate medie (*Sc*, *S111*, și *Sc370*) și tulpini cu activitate scăzută (*Sp519*, *Scarl28*, *Sb1324*, *Sc135*, *Sc499* și *Sp512*).
- Înlocuirea promotorului inductibil cu promotorul constitutiv, *Actp*, la nivelul *SmaI/XbaI*, în vectorul de exprimare *p3003*, a determinat transcrierea genei hibrid SPS-Bgl1 la un nivel mult mai înalt.
- Utilizarea promotorului constitutiv, *pAct*, determină creșterea ratei transcrierii genei hibrid *STA1-Bgl1* și prin urmare și nivelul de exprimare enzimatic pentru tulpinile de drojdii selectate și testate, atingând valoarea de 326 mU/mL, pentru drojdia de kefir (*Su48*) sau valori enzimatic cuprinse între 130 și 253 mU/mL pentru tulpina de laborator, drojdiile de vin (cu excepția *Sc135*), tulpina probiotică și drojdia de panificație.

Capitolul 8

Fermentația alcoolică pe substrat cu 6% celobioză. Bioetanolul este cel mai nou și important combustibil de pe piață (Purwardi și colab., 2007) iar obținerea sa din biomasa lignocelulozică

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

reprezintă direcția de cercetare a multor laboratoare din lume. Hidroliza celulozei în zaharuri solubile care să poată fi ulterior metabolizate de către celulă se poate realiza prin acțiunea a diverse enzime. Acestea includ acțiunea endoglucanazelor (EG) (EC 3.2.1.4), a exoglucanazelor (EC 3.2.1.74), a celobiohidrolazelor (CBH) (EC 3.2.1.91) și a β -glucozidazelor (BGL) (EC 3.2.1.21), care realizează scindarea celobiozei în monomeri de glucoză (van Zyl și colab., 2007). Prin transformarea celor 11 tulpini de drojii industriale (*Sc135*, *Sc305*, *Sc370*, *Sc491*, *Sc499*, *Sp512*, *Sp519*, *Sb1324*, *S111*, *Su48* și *Scarl28*) cu *pAct-SPS-Bgl1-3003* au rezultat tulpini noi, cu activitate β -glucozidazică, care a fost confirmată atunci când s-a utilizat ca substrat *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranozid sau celobioza. Pentru cinci dintre tulpinile recombinante (*Su48*, *Sc*, *Sc491*, *Sc305* și *Sc499*) s-a reprezentat grafic dinamica CO_2 eliberat prin fermentația mediului YP cu 6% celobioză (figura 8.1).

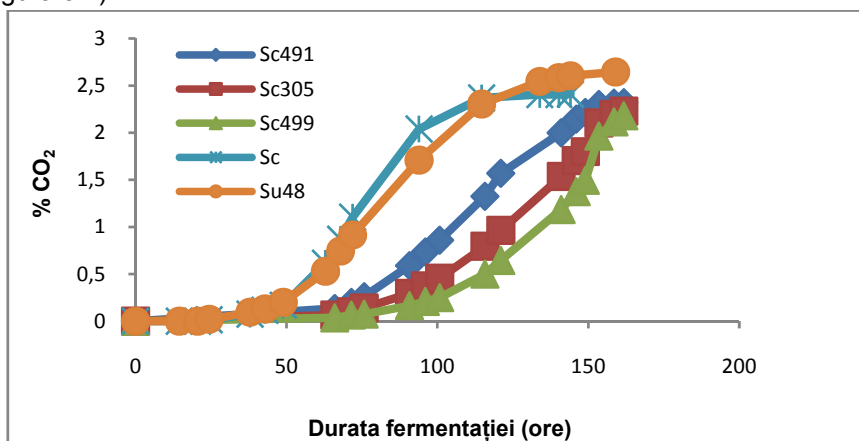


Figura 8.1. Dinamica CO_2 rezultat din fermentația mediului YP cu 6% celobioză

La sfârșitul perioadei de fermentație s-a determinat concentrația de etanol pe baza ecuației generale a fermentației ținând cont de cantitatea totală de dioxid de carbon eliberată (figura 8.2).

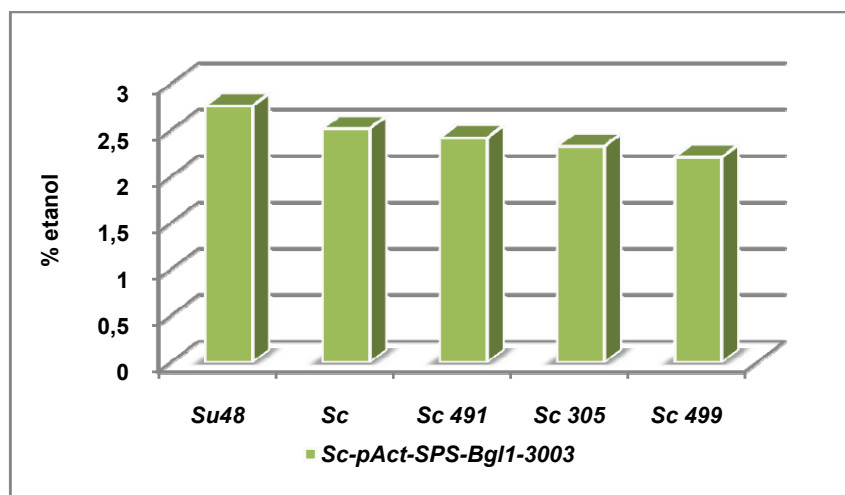


Figura 8.2. Concentrația de etanol formată de tulpinile *Su48*, *Sc*, *Sc491*, *Sc305* și *Sc499*, transformate cu *pAct-SPS-Bgl1-3003*, prin fermentația mediului YP cu 6% celobioză

Concentrația de etanol obținută și evidențiată în figura 8.2, demonstrează transformarea eficientă a celobiozei pe parcursul celor 6 zile de fermentație. În tabelul 8.1 sunt prezentate cantitățile de celobioză utilizate de către transformanți în procesul fermentativ cât și valorile randamentului în alcool. Cantitatea de celobioză consumată de fiecare transformant în parte a fost calculată teoretic din ecuația fermentației celobiozei, în funcție de cantitatea de etanol obținută.

Pentru a separa glucoza și celobioza din mediul de fermentație al tulpinii *Sc-pAct-SPS-Bgl1* s-a utilizat cromatografia de înaltă performanță cu schimb anionic (HPAE-*High Performance Anionic Exchange*). Pentru aceasta, mediul de cultură cu 6% celobioză, fermentat de către tulpina de laborator transformată cu *pAct-SPS-Bgl1-3003*, a fost diluat de 50 de ori, filtrat și injectat în coloana CarboPac PA-100. Pentru recunoașterea picurilor glucozei și celobiozei din cromatograma obținută s-au injectat, separat, în aceeași coloană soluții standard, de concentrație 10 μM de glucoză și celobioză (figura 8.3).

Totodată, din analiza cromatogramei corespunzătoare mediului de fermentație a tulpinii recombinante *Sc*, s-a evidențiat că, după aproximativ 6 zile de fermentație o cantitate mică de celobioza a rămas netransformată, remarcându-se totodată că, această tulpină testată care este capabilă să exprime fragmentul genic *SPS-Bgl1* a realizat și o buna conversie a substratului celobiozic în etanol.

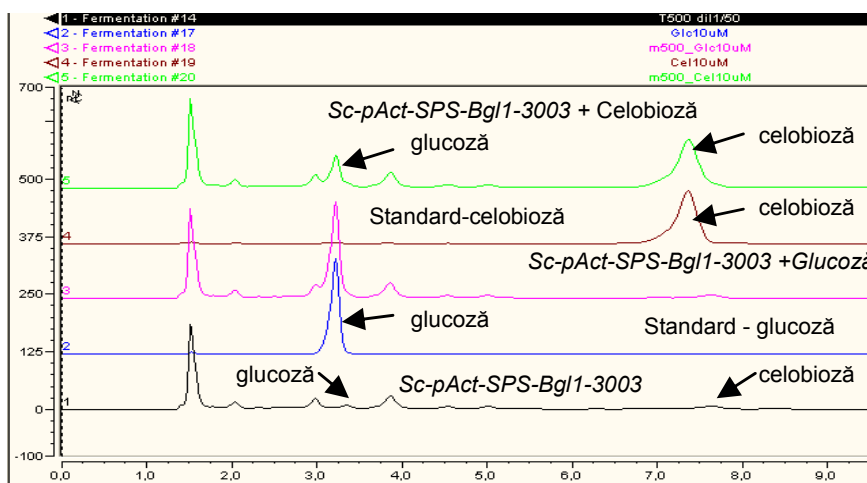


Figura 8.3. Separarea izocratică a glucozei și celobiozei din mediul de fermentație a tulpinii *Sc-pAct-SPS-Bgl1-3003* (negru). Analiza HPAE- CarboPac PA-100 a soluțiilor standard de glucoză (albastru) și celobioză (maro). Separarea și evidențierea picurilor glucozei (roz) și celobiozei (verde) din amestecul mediului de fermentație al tulpinii *Sc-pAct-SPS-Bgl1-3003* cu soluția standard-glucoză (roz) și soluția standard-celobioză (verde)

Fermentația alcoolică pe substrat cu 28% celobioză. În vederea testării potențialului fermentativ al fiecărui transformant în parte, cât și a activității β-glucozidazice pe substrat celobiozic s-a realizat inocularea acestora în mediu cu celobioză și incubarea în condiții anaerobe, la temperatura de 30°C. Concentrația inițială de celobioză a fost de 7%. Prima determinare a concentrației de etanol s-a realizat după 72 de ore, iar următoarele determinări s-au realizat din 24 în 24 de ore cu ajutorul kitului comercial Enzytec™ fluid Ethanol (Scil Diagnostics GmbH). În funcție de producția de etanol a fiecărui transformant în parte, s-au mai adăugat în mediul de cultură câte 7% celobioză, la intervale de 24 de ore sau 48 de ore, în așa fel încât, concentrația finală de celobioză utilizată în fermentație a fost de 28% pentru tulpinile transformate *Sc*, *Su48*, *Sc499*, de 21% pentru tulpina *Sc491* și de 14% pentru *Sc305*, *S111*, *Sp519*, *Sb1324*, *Sp512* și

Sc370. În figura 8.4 și figura 8.5 este redată dinamica producției de etanol a tulpinilor de drojdie transformate cu pAct-SPS-Bgl1-3003, pe parcursul a 8 zile.

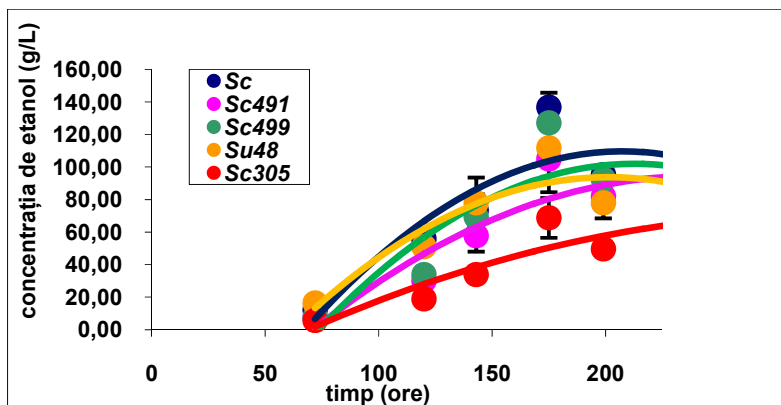


Figura 8.4. Dinamica producerii de etanol de către transformanții Sc, Sc491, Sc499, Su48 și Sc305, etanol rezultat din fermentația a X% celobioză în concentrație finală, (unde X%= 28% pentru Sc, Su48, Sc499; X%=21% pentru Sc491; X%=14% pentru Sc305)

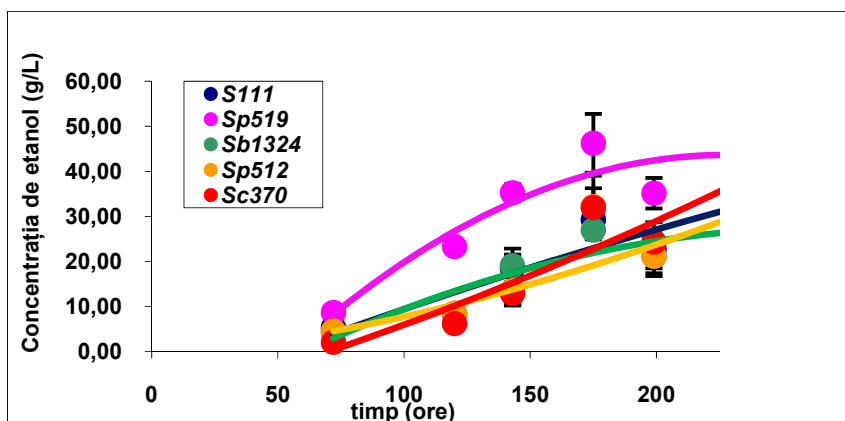


Figura 8.5. Dinamica producerii de etanol de către transformanții S111, Sp519, Sb1324, Sp512 și Sc370, etanol rezultat din fermentația mediului YP cu 14% celobioză în concentrație finală

De asemenea, și celelalte tulpini modificate genetic în scopul producerii β -glucozidazei purtătoare a secvenței semnal Sta1 de la *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, și anume: Sc305, S111, Sp519, Sb1324, Sp512 și Sc370, au fost capabile să transforme anaerob celobioza, producând etanol în concentrații mult mai mici comparativ cu tulpinile menționate anterior dar nu mai puțin de 2,5% (figura 8.5). Rezultatele obținute evidențiază faptul că, cel puțin pentru aceste tulpini de drojdie, hidroliza celobiozei nu reprezintă un blocaj pentru producerea de bioetanol dacă se pornește de la celuloză. Tulpinile Sc, Sc499 și Sc48 obținute prin transformarea fragmentului genic, SPS-Bgl1, codificator al β -glucozidazei purtătoare a secvenței semnal de la STA1, au realizat o conversie de 0.53 g etanol per gram de celobioză consumată, cu 0.13 grame de etanol / gram de celobioză consumată mai mult decât tulpina Y294. În tabelul 8.2 sunt prezentate detalii asupra procentelor de celobioză consumată de tulpinile utilizate în procesul fermentativ, așa cum

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

rezultă din ecuația de conversie a celobiozei în etanol, în funcție de procentul de etanol obținut la finalul fermentației.

Tabelul 8.2. Cantitatea de celobioză consumată și randamentul în alcool al tulpinilor recombinante și crescute în mediu YP cu diferite concentrații de celobioză

Tulpina transformată cu pAct-SPS-Bgl1-3003	Cantitatea de celobioză din mediu (grame/100mL mediu)	Cantitatea teoretică de celobioză consumată (grame/100mL mediu)	Randamentul în alcool (%)
Sc	28 g	20,35 g	72,67%
Sc499	28 g	18,45 g	65,91%
Su48	28 g	17,57 g	62,74%
Sc491	21 g	16,6 g	79,18%
Sc305	14 g	10,85 g	77,54%
Sp519	14 g	7,54 g	53,91%
Sc370	14 g	4,99 g	35,72%
S111	14 g	4,65 g	33,25%
Sp512	14 g	4,40 g	31,46%
Sb1324	14 g	4,74 g	33,83%

Graficul din figura 8.6 s-a realizat pentru evidențierea unei corelații între activitatea β -glucozidazică a transformanților și producția de etanol atunci când se utilizează celobioza ca sursă de carbon. Deoarece valoarea coeficientului de corelație liniară al seriei bidimensionale (activitatea β -glucozidazei hibrid/concentrația de etanol) este pozitiv, se evidențiază o corelație liniară directă între cele două dimensiuni pentru marea majoritate a tulpinilor, cu excepția Sc499, S111 și Sc135. Acest rezultat ar putea fi explicat prin diferențele existente în ceea ce privește potențialul fermentativ al transformanților.

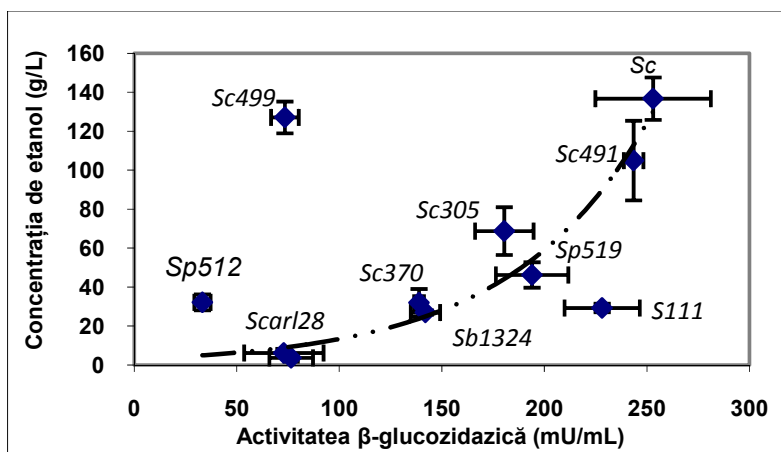


Figura 8.6. Corelația dintre producția de etanol și activitatea β -glucozidazică a tulpinilor de drojii transformate cu pAct-SPS-Bgl1-3003

Pentru a verifica această ipoteză, toți transformanții au fost testați cu privire la modul de realizare a fermentației în mediu cu 20% glucoză, măsurându-se procentul de etanol obținut

după 24 de ore, 48 de ore, 72 de ore și 120 de ore, de la momentul începerii experimentului. Din figura 8.8 se pot determina valorile concentrației de etanol cât și diferențele existente între transformanți, în ceea ce privește producția de alcool obținut prin fermentația realizată pe substratul preferat al drojdiilor, glucoza. Din analiza diagramei (figura 8.7) nu se constată diferențe semnificative între tulpina *Sc491* și tulpina *petite*, *Sc499*, derivată din *Sc491*, în ceea ce privește procentul final de etanol.

În toate cazurile, producția de etanol rezultată din substratul, celobioză, a fost mult mai scăzută comparativ cu producția de etanol rezultată direct din glucoză, cu o lungă fază de latență. După aproximativ 125 de ore de la inoculare transformanții au atins 50% din valoarea maximă a etanolului determinată după 175 de ore de fermentație. Diferențele în ceea ce privește eficiența tulpinilor de drojii industriale obținute, în a transforma celobioza au la bază nivelul de exprimare al β -glucozidazei precum și *background*-ul genetic al fiecărei tulpini în parte.

Se poate afirma că, există o corelație între cele două variabile luate în calcul pentru marea majoritate a tulpinilor industriale transformate cu *pAct-SPS-Bgl1-3003*, cu excepția *Sc499*, *Sp512* și *S111*. Posibila explicație ar putea fi aceea că, în condițiile în care concentrația de glucoză din mediu este scăzută (condiții asemănătoare celor în care se utilizează celobioza), enzimele respiratorii sunt represate diferit la cele trei specii: *S. cerevisiae* (*Sc499-tulpina petite* provenită din *Sc491*), *S. pastorianus* (*Sp512*) și *S. boulardii* (*S111*).

O situație interesantă rezultă din comparația fenotipurilor *Sc491* și *Sc499*, tulpini care evidențiază un mod similar de fermentație al celobiozei deși există o mare diferență în ceea ce privește sinteza de β -glucozidază. Deoarece *Sc499* este tulpina *petite* provenită din *Sc491* activitatea mitocondrială pare a fi un factor cheie în eficiența cu care celobioza este transformată în etanol. În cazul celorlalte două tulpini o posibilă explicație a neconcordanței dintre producția scăzută de etanol obținută pe substrat celobiozic și buna activitatea β -glucozidazică ar putea fi oferită de efectul Pasteur negativ descoperit inițial la drojdiile de bere și de vin din genul *Saccharomyces*.

Prin efectul Pasteur negativ se produce inhibarea fermentației alcoolice chiar în absența oxigenului liber. Cercetările efectuate încă din 1968 (Wiken, 1968) au arătat că acest efect se produce la stadiul de hexokinază și este cauzat în principal de o lipsă de ATP.

Concluzii

- S-au obținut prin transformarea cu vectorul plasmidial de exprimare, *pAct-SPS-Bgl1-3003*, 11 tulpini de drojii industriale (*Su48*, *Sc491*, *Sc305*, *Sc499*, *Sp519*, *Sc370*, *S111*, *Sb1324*, *Sp512*, *Scar128*, *Sc135*) și o tulpină de laborator (*Sc*) capabile să crească pe mediu cu celobioză în condiții aerobe și să realizeze conversia acestui substrat în etanol, în condiții de anaerobioză.
- Realizarea grafică a corelației dintre concentrația de etanol și activitatea β -glucozidazică exprimată de tulpinile transformate cu fragmentul genic *SPS-Bgl1* a evidențiat o concordanță între cele două variabile considerate pentru aproximativ toate tulpinile testate cu excepția tulpinii *petite Sc499*, a tulpinii probiotice *S111* și a drojdiei de bere *Sp512*.

CONCLUZII FINALE

Rezultatele experimentelor realizate în vederea susținerii obiectivelor tezei de doctorat sunt următoarele:

- S-au construit șase vectori plasmidiali de exprimare *pBgl1*, *pST-Bgl1*, *pSPS-Bgl1*, *pSPS-Bgl1-D0*, *pSPS-Bgl1-D1* și *pSTA1-FLD* prin inserarea genelor hibrid rezultate din interschimbul fragmentelor codificatoare ale domeniului *fibronectin-like* (FLD) și regiunii bogate în aminoacizii serină-treonină (STRD), în *pEMBLYex4*.
- A fost transformată tulpina de laborator *S. cerevisiae* BY4741 cu fiecare dintre vectorii plasmidiali *pBgl1*, *pST-Bgl1* și *pSPS-Bgl1* și s-a evidențiat exprimarea genelor hibrid *bgl1/STA1*, care-i oferă astfel tulpinii de drojdie posibilitatea dezvoltării pe mediu cu celobioză, caracteristică neevidențiată la tulpina parentală.
- A fost verificată activitatea β -glucozidazică manifestată de transformanți pe substratul *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranozid, observându-se astfel că, activitatea enzimei heteroloage exprimată de tulpina *Sc-pST-Bgl1*, deși mai scăzută decât activitatea exprimată de transformanții *Sc-pSPS-Bgl1*, totuși a fost considerabil mai ridicată decât cea manifestată de *Sc-pBgl1*. Rezultă de aici că, domeniul serină-treonină (STRD) nu împiedică manifestarea funcției enzimatică dar nici nu intervine în secreția enzimatică așa cum s-a crezut anterior.
- S-a constatat o similaritate de 31% între domeniul C-terminal al β -glucozidazei izolată de la *Saccharomycopsis fibuligera* și domeniul C-terminal al fibronectinei III de la *Thermotoga neapolitana* în urma alinierii secvențelor de aminoacizi a domeniului C-terminal al β -glucozidazei izolată de la *Saccharomycopsis fibuligera* cu secvențele de aminoacizi ale altor domenii C-terminale din cadrul glicozil-hidrolazelor familiei GH3, cu secvența de aminoacizi a domeniului C-terminal de la nivelul fibronectinei III a bacteriei *Thermotoga neapolitana* și cu secvența de aminoacizi a domeniului CARDB de la două enzime bacteriene încadrate în aceeași familie a glicozil-hidrolazelor. Datorită acestei similarități în secvența de aminoacizi, domeniul C-terminal al β -glucozidazei a fost denumit fibronectin-like domain (FLD).
- S-a evidențiat că, în secvența de aminoacizi a enzimei recombinată SPS-Bgl1 există numeroase puncte posibile pentru N-glicozilarea realizată prin atașarea N-acetilglucozaminei (GlcNAc) la asparagina lanțului proteic.
- S-a realizat clonarea fragmentului genic SPS-Bgl1 în vectorul *pKS₂*, la nivelul situsului *SphI*, rezultând vectorul plasmidial *pGal-SPS-Bgl1-3003*, care a favorizat exprimarea genei inserate
- în 11 tulpini de drojdie industriale (*Sc135*, *Sc305*, *Sc370*, *Sc491*, *Sc499*, *Sp512*, *Sp519*, *Sb1324*, *S111*, *Su48* și *Scar128*) și în tulpina de laborator *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.
- S-a demonstrat că, pentru majoritatea tulpinilor de drojdie analizate, peste 70% din activitatea hidrolitică a β -glucozidazei heteroloage s-a remarcat la nivelul peretelui celular, rezultat care este în acord cu funcția acordată domeniului *fibronectin-like* de a permite atașarea celulară a enzimei purtătoare.
- S-au obținut tulpini noi capabile să hidrolizeze și substraturile celobiozice prin transformarea tulpinilor de drojdie din genul *Saccharomyces* cu vectorul de exprimare ce conține ca insert gena heteroloagă SPS-Bgl1 sub controlul transcripțional al promotorului inductibil.
- S-a dedus că, utilizarea promotorului constitutiv a determinat transcrierea genei recombinată SPS-Bgl1 la un nivel mult mai înalt comparativ cu cea determinată de promotorul inductibil.

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

- S-a înregistrat o creștere progresivă de la 24 de ore la 72 de ore de la inițierea culturii în mediu YPD cu geneticină 50 mg/l a activității β -glucozidazei inserate prin transformarea cu *pAct-SPS-Bgl1-3003* a tulpinilor de drojdii industriale utilizate.
- S-a demonstrat posibilitatea creșterii pe mediu cu celobioză în condiții aerobe dar și eficiența conversiei acestui substrat în etanol, în condiții anaerobe a tulpinilor rezultate prin transformarea cu vectorul plasmidial de exprimare care conține secvența genică recombinată *SPS-Bgl1* sub controlul promotorului constitutiv, *Actp*.
- Au fost sugerate alte direcții de cercetare și alte posibile utilizări ale drojdiilor: drojdiile de vin, *Sc135*, *Sc305* și *Sb1324*, cu activitate β -glucozidazică pot fi utilizate nu numai pentru obținerea bioetanolului, ci și în scopul îmbunătățirii aromei și culorii diferitelor sortimente de vinuri datorită capacității β -glucozidazei recombinante obținute de a hidroliza glicozidele precum, antocianii și de a elibera compușii de aromă și culoare legați de aceștia.

Bibliografie selectivă

Adam AC, Latorre-Garcia L, Polaina J. 2004. Structural analysis of glucoamylase encoded by the *STA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*). *Yeast* 21: 379-388.

Ai Y.C., Meng F. M. 2000. Molecular cloning and sequencing of a beta-glucosidase gene from *Aspergillus niger* AMS11. Submitted to the EMBL/GenBank.

Alfenore, S., X. Cameleyre, L. Benbadis, C. Bideaux, J. L. Uribelarrea, G. Goma, C. Molina-Jouve, and S. E. Guillouet. 2004. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fedbatch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:537–542.

An C.L., Lim W.J., Hong S.Y., Kim E.J., Shin E.C., Kim M.K., Lee J.R., Park S.R., Woo J.G., Lim Y.P., Yun H.D. 2004. Analysis of *bgl* operon structure and characterization of beta-glucosidase from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:2270-2278.

Attfeld, P. V., and P. J. L. Bell. 2003. Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts. In J. H. de Winde (ed.), *Functional genetics of industrial yeasts*. Springer, Berlin, Germany. p. 17–55.

Bakker, B. M., K. M. Overkamp, A. J. van Maris, P. Kotter, M. A. Luttkik, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk. 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:15–37.

Becker, J., and E. Boles. 2003. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4144–4150.

Berrin, J.G., McLauchlan, W.R., Needs, P., Williamson, G., Puigserver, A., Kroon, P.A., and Juge, N. 2002. Functional expression of human liver cytosolic β -glucosidase in *Pichia pastoris*. *Eur.J.Biochem.* 269: 249-258.

Bhatia, Y., Mishra, S., and Bisaria, V.S. 2002. Biosynthetic activity of recombinant *Escherichia*

coli expressed *Pichia etchellsii* β -glucosidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103, 367-369.

Byrne, L.J., O'Callaghan, K.J., Tuite, M.F., 2005. Heterologous gene expression in yeast. *Methods Mol. Biol.* 308, 51-64.

Briante, R., Cara, F.L., Febbraio, F., Barone, R., Piccialli G., Carolla, R., Mainolfi, P., Napoli L.D., Patumi, M., Fontanazza, G., Nucci, R. 2000. Hydrolysis of oleuropein by recombinant β -glycosidase from hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus* immobilized on chitosan matrix. *J. Biotechnol.* 77: 275-286.

Bryson K, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ. 2005. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res* 33: W36-W38.

Bro, C., B. Regenberg, J. Forster, and J. Nielsen. 2006. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab. Eng.* 8:102–111.

Bro, C., S. Knudsen, B. Regenberg, L. Olsson, and J. Nielsen. 2005. Improvement of galactose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of phosphoglucomutase: example of transcript analysis as a tool in in silico metabolic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6465–6472.

Chothia C, Gough J. 2009. Genomic and structural aspects of protein evolution. *Biochem J* 419: 15-28.

Daran-Lapujade, P., S. Rossell, W. M. van Gulik, M. A. Luttk, M. J. De Groot, M. Slijper, A. J. Heck, J. M. Daran, J. H. de Winde, H. V. Westerhoff, J. T. Pronk, and B. M. Bakker. 2007. The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:15753–15758.

Galbe, M., P. Sassner, A. Wingren, and G. Zacchi. 2007. Process engineering economics of bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108:303–327.

Ha JS, Lee YM, Choi SL, Song JJ. 2008. Thermostable beta-glycosidase-CBD fusion protein for biochemical analysis of cotton scouring efficiency. *J Microbiol. Biotechnol.* 18: 443-448.

Hahn-Hagerdal, B., K. Karhumaa, C. Fonseca, I. Spencer-Martins, and M. F. Gorwa-Grauslund. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:937–953.

Holm L, Kaariainen S, Rosenstrom P, Schenkel A. 2008. Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* 24: 2780-2781.

Ito, J., Y. Fujita, M. Ueda, H. Fukuda, and A. Kondo. 2004. Improvement of cellulose-degrading ability of a yeast strain displaying *Trichoderma reesei* endoglucanase II by recombination of cellulose-binding domains. *Biotechnol. Prog.* 20:688–691.

Kyla-Nikkila K, Alakuijala U, Saris PE. 2010. Immobilization of *Lactococcus lactis* to cellulosic material by cellulose-binding domain of *Cellvibrio japonicus*. J. Appl. Microbiol.

Kumar P, Satyanarayana T. 2009. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. Crit Rev Biotechnol 29: 225-255.

Kumar R, Singh S, Singh OV. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol 35: 377-391.

Pastor FJ, Gallardo O, Sanz-Aparicio J, Díaz P. 2007. Xylanases: Molecular properties and applications. In: Polaina J, MacCabe AP (eds) Industrial enzymes: structure, function and applications. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 65-82.

Xu Y, Foong FC. 2008. Characterization of a cellulose binding domain from *Clostridium cellulovorans* endoglucanase-xylanase D and its use as a fusion partner for soluble protein expression in *Escherichia coli*. J. Biotechnol 135: 319-325.

Rezultatele științifice

Julia Marín-Navarro, **Leontina Gurgu**, Santiago Alamar, Julio Polaina. 2010. Structural and functional analysis of hybrid enzymes generated by domain shuffling between *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*) Sta1 glucoamylase and *Saccharomycopsis fibuligera* Bgl1 β -glucosidase – Appl. Microbiol. Biotechnol., Online First™, 8 September 2010. <http://www.springerlink.com/content/a7070177m6153772/abstract/>.

Julia Marín Navarro, **Leontina Gurgu**, Santiago Alamar and Julio Polaina. Structural and functional analysis of hybrid enzymes containing catalytic and non-catalytic domains from *Sacharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*) Sta1 glucoamylase. Fourth Symposium on the alpha-amylase family, September 26th - 30th, 2010, Smolenice –Slovakia.

Leontina Gurgu, Vasilica Barbu, Clemansa Tofan. 2009. Fusion between serine-threonine reach domain from *Sta1* gene with *Bglb* gene of the *Paenibacillus polymyxa*, Innovative Romanian Food Biotechnology, Vol. 5, 31-37, <http://www.bioaliment.uqal.ro/revista/5/paper%2055.pdf>.

Leontina Gurgu (Petrea), Clemansa Tofan. 2008. Characterization of *Saccharomyces carlsbergensis* mutants obtained by nitrous acid mutagenesis. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies 14 (2008) 312-317. http://www.japt.tpa.usabtm.ro/arhivalucrari/2008/vol/L71_Vol%20XIV_2008_Petrea_Leontina_poster.pdf.

Leontina Petrea (Gurgu). 2008. Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained by UV mutagenesis. Innovative Romanian Food Biotechnology, Vol. 2, 40-44. <http://www.bioaliment.uqal.ro/revista/2/Paper5pfit.pdf>.

STUDII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE INGINERIE GENETICĂ ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚIRII PROCEDEELOR FERMENTATIVE TRADIȚIONALE

Leontina Gurgu, Clemansa Tofan. 2007- Manipulating the yeast's genome *in vitro* with plasmids- Proceedings of the 1st International Conference Environment Natural Sciences in Food Industry In European Context, Baia Mare, November, 16st - 17st 2007, ISBN 978-973-1729-39-8, 489-496.

Leontina Gurgu, Clemansa Tofan. 2007 - Genetic diversity and evolution of fermentation yeast from *Saccharomyces sensu stricto complex*, Annals of Suceava University – Food Engineering, Year VI, No 2 – 2007, ISSN 1842 – 4597, 65-74.