

УДК 579.66

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ БАКТЕРИЙ РОДА *Geobacillus*, НАПРАВЛЕННЫХ НА ПОЛУЧЕНИЕ ЭТАНОЛА И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

© 2013 г. А.С. Розанов, И.А. Мещерякова, С.В. Шеховцов, С.Е. Пельтек

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: miren@ngs.ru, asroza@gmail.com, shekhovtsov@bionet.nsc.ru, peltek@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15 августа 2013 г. Принята к публикации 5 сентября 2013 г.

Термофильные бактерии находят все более широкое применение в биотехнологии. Одними из наиболее перспективных термофилов являются представители рода *Geobacillus*. В статье рассмотрены известные на данный момент методики генетической и метаболической инженерии этих микроорганизмов, а также примеры их использования в различных отраслях биотехнологии.

Ключевые слова: *Geobacillus*, термофилы, биотехнология, генетическая инженерия.

ВВЕДЕНИЕ

Современные химическая, нефтехимическая и топливная отрасли промышленности базируются на использовании огромного количества органических веществ. На сегодняшний день значительная часть органических соединений добывается из ископаемых источников, что отрицательно влияет на экологию планеты. Кроме того, полезные ископаемые оказываются во все более трудноизвлекаемой форме, а объем потребления непрерывно растет, что приводит к увеличению затрат на добычу сырья и росту цен на продукты, полученные из него.

Ввиду постоянного роста цен на ископаемые источники, а также по причине развития биологических дисциплин регулярно появляются новые и развиваются уже известные биотехнологические процессы получения органических веществ. С момента возникновения промышленных производств микроорганизмы активно использовались в различных процессах, изначально это были процессы получения кисломолочных продуктов, продуктов спиртового, уксусного брожения, силосования, а также

многие другие. В настоящее время актуальным направлением развития биотехнологий является разработка процессов, которые в перспективе смогут сократить использование полезных ископаемых, а в отдаленном будущем полностью исключить их использование.

РАЗВИТИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ КЛЕТОЧНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ

В 20-м веке происходило бурное развитие биологических наук: общей биологии, микробиологии, генетики и молекулярной биологии. Знаковым событием для биологии как академической науки и биотехнологии как отрасли экономики стало развитие методов секвенирования. В 1970-е годы секвенирование фрагментов генов 16S рРНК показало, что настоящее разнообразие микроорганизмов многократно превышает возможности его изучения традиционными морфологическими методами (Woese *et al.*, 1975). Секвенирование геномов микроорганизмов, сначала прокариотического, затем эукариотического происхождения пролило свет на процессы, происходящие в клетке.

Дальнейшее развитие технологий привело к появлению метода параллельного секвенирования и сделало возможным использование методов полногеномного секвенирования в повседневной работе отдельной лаборатории. Полученный таким образом материал о генетических последовательностях, нарастающий лавинообразно с каждым годом, дал толчок к изучению свойств белков, межгенных взаимодействий и способов регуляции в геноме. Значительный вклад в развитие биологического знания привнесло усовершенствование вычислительных алгоритмов, связанное с ростом вычислительных мощностей, в результате чего возникла отдельная наука – биоинформатика.

Накопленные знания о клеточных процессах вместе с применением методов генетической инженерии в настоящее время позволяют манипулировать метаболическими процессами клетки путем внесения изменений в ее геном. При этом, благодаря применению биоинформатических алгоритмов, возможно предварительно смоделировать наиболее перспективный вариант преобразований генома для получения целевого продукта метаболизма.

ЗАДАЧИ, СТОЯЩИЕ ПЕРЕД СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИЕЙ

Для любых технологических процессов, в том числе биотехнологических, основными критериями успешного применения являются эффективность и экономическая обоснованность. В настоящее время одним из ключевых направлений биотехнологических исследований в области получения спирта и органических кислот является проблема использования в качестве первоначального источника вещества растительной биомассы или выделенных из нее сахаров. В отличие от традиционно используемых для этой цели зерен или плодов, состоящих преимущественно из крахмала или сахарозы, растительная биомасса состоит из целлюлозы и гемицеллюлозы, при этом до 40 % всех сахаров в ней составляют пентасахариды, в основном ксилоза. Эти сахара отсутствуют в крахмалосодержащем сырье. В связи с этим возникла задача поиска и разработки продуцентов, способных усваивать пентозы, поскольку метаболизм микроорганизмов, традиционно используемых для

получения биоспирта и органических кислот, к этому не приспособлен. Другим приоритетным направлением развития биотехнологии является разработка процессов и схем, не требующих больших затрат энергии на их выполнение. Большинство биотехнологических процессов полного цикла включают высокотемпературную обработку либо на стадии подготовки сырья, либо на стадии выделения продукта. Особенно актуальна высокотемпературная обработка при использовании целлюлозы в качестве источника биоэтанола, так как ее гидролиз значительно облегчается при повышенных температурах. Выделение биоэтанола также проводится при повышенных температурах. При этом ферментирование сахаров, полученных при гидролизе лигноцеллюлозы мезофильными микроорганизмами, будет требовать сначала охлаждения, потом нагрева. Избежать необходимости постоянного охлаждения больших объемов растворов можно при проведении ферментирования с использованием термофильных микроорганизмов в качестве клеточных катализаторов. Использование термофилов позволяет проводить многие стадии биотехнологических процессов при температурах свыше 50 °С, в результате чего облегчается экстракция некоторых летучих продуктов (например спиртов) и поддержание анаэробных условий из-за меньшей растворимости кислорода. Кроме того, высокие температуры приводят к снижению вероятности контаминации. В настоящее время в этом направлении активно изучаются следующие микроорганизмы: *Clostridia*, *Thermoanaerobacter*, *Caldicellulosiruptor*, *Thermotoga*, *Pyrococcus*, *Anoxybacillus* и *Geobacillus* (Taylor *et al.*, 2009; Verhaart *et al.*, 2010; Goh *et al.*, 2013). Из вышеприведенного списка особый интерес представляют бактерии рода *Geobacillus* и *Anoxybacillus*, которые, в отличие от бактерий рода *Clostridia*, способны жить в присутствии кислорода. В то же время бактерии рода *Geobacillus* в отличие от *Thermotoga* и *Pyrococcus* живут при температурах, близких к умеренным, что позволяет применять для селекции некоторые маркеры устойчивости к антибиотикам, используемые для манипуляции с мезофильными микроорганизмами. Род *Anoxybacillus* практически не изучен в плане применения методов манипуляций с геномом и применения в биотехнологии.

СИСТЕМАТИКА РОДА *GEOBACILLUS*

Представители рода *Geobacillus* являются грамположительными термофильными палочковидными бактериями, аэробными или факультативно анаэробными. Довольно долго единственным облигатным термофилом, относящимся к роду *Bacillus*, был *Bacillus stearothermophilus* (Donk, 1920). В 1949 г. Gordon и Smith (1949) провели ревизию 206 термофильных штаммов рода *Bacillus*, в результате которой 46 из них они отнесли к мезофильным видам, а остальные разделили между двумя видами, *B. stearothermophilus* и *B. coagulans*. В последующие десятилетия число видов постепенно росло. В 1993 г. White с соавт. исследовали 234 термофильных штамма рода *Bacillus* при помощи нескольких методов (фенотипические характеристики, различные физиологические тесты, гибридизация ДНК) и заключили, что их выборку можно разделить на 18 видов (White *et al.*, 1993).

Методы секвенирования ДНК изменили систематику рода *Bacillus*. Ash с соавт. построили филогенетические деревья по генам 16S рРНК 51 штамма рода *Bacillus*. Род *Bacillus* оказался полифилетичным и разделился на 5 ветвей, причем термофильные его представители: *B. stearothermophilus*, *B. kaustophilus* и *B. thermoglucosidasius* были отнесены к группе 5. В результате этой и последующих работ из рода *Bacillus* было выделено более десятка новых родов (Ash *et al.*, 1991).

В 2001 г. Т. Назина с соавт. выделили новый род *Geobacillus*, к которому отнесли 6 видов, ранее относимых к роду *Bacillus* (*Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenu-latus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* и *Geobacillus thermodenitrificans*), и два новых вида, выделенных в данной работе: *Geobacillus subterraneus* и *Geobacillus uzunensis* (Nazina *et al.*, 2001). Позднее к роду *Geobacillus* были отнесены несколько новых видов: *Geobacillus toebii* (Sung *et al.*, 2002), *Geobacillus debilis* (Banat *et al.*, 2004), *Geobacillus lithuanicus* (Kuisiene *et al.*, 2004), *Geobacillus gargensis* (Nazina *et al.*, 2004), еще несколько предполагаемых видов имеют неопределенный статус. Кроме того, к роду *Geobacillus* причислены из других ро-

дов: *Saccharococcus caldxylosilytic* (Fortina *et al.*, 2001), *Bacillus pallidus* (Banat *et al.*, 2004), *Bacillus Vulcani* (Nazina *et al.*, 2004), *Bacillus thermantarcticus* (Coorevits *et al.*, 2011). В дальнейшем был выделен новый род *Aeribacillus*, в который был перенесен вид *B. pallidus* (Micana-Galbis *et al.*, 2010). Coorevits с соавт. перенесли виды *Geobacillus caldoproteolyticus* и *Geobacillus tepidamans* в род *Anoxybacillus*, а вид *G. debilis* выделили в новый род *Caldibacillus* (Coorevits *et al.*, 2011). Надо отметить, что валидность некоторых новых видов подвергается сомнению. Так, Dinsdale с соавт. считают, что *G. kaustophilus*, *G. lithuanicus* и *G. vulcani* следует объявить синонимами *G. thermoleovorans*, а *G. gargensis* является синонимом *G. thermocatenu-latus* (Dinsdale *et al.*, 2011). В целом можно заключить, что систематика рода *Geobacillus* находится лишь в начале своего становления.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *GEOBACILLUS*

Термофильные бактерии рассматриваются в первую очередь как источник термостабильных ферментов. В последние годы значительное количество генов термофильных ферментов было выделено из геномов бактерий рода *Geobacillus* для гетерологичной экспрессии в мезофильных бактериях. Среди них, например, липазы (Abdel-Fattah, Gaballa, 2008; Quintana-Castro *et al.*, 2009; Cheong *et al.*, 2011; Ebrahimpour *et al.*, 2011; Balan *et al.*, 2012), ферменты, участвующие в расщеплении лигноцеллюлозной биомассы: β -глюкозидазы (Shallom *et al.*, 2005; Ben-David *et al.*, 2007; Wagschal *et al.*, 2009; Ratnadewi *et al.*, 2013), эндоглюканазы (Ng *et al.*, 2009), ксиланазы (Wu *et al.*, 2006; Canakci *et al.*, 2007, 2012; Gerasimova, Kuisiene, 2012; Liu *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2013) и многие другие белки.

В последние несколько лет бактерии рода *Geobacillus* стали активно использовать в качестве клеточных катализаторов и продуцентов белка. Так, штамм *Geobacillus* sp. XT15 способен производить ацетоин и 2,3-бутандиол из различных сахаров (Xiao *et al.*, 2012). *Geobacillus* sp. T1 используется как источник смеси целлюлаз, применяемой для расщепления лигноцеллюлоз-

ной биомассы (Assareh *et al.*, 2012). De Bendetti с соавт. иммобилизовали *G. stearothermophilus* СЕСТ 43 на агарозе для получения 2,6-диаминопуридин-2'-дезоксирибозиды и 2,6-диаминопуридинрибозиды (De Bendetti *et al.*, 2012). Azfal с соавт. использовали *G. stearothermophilus* для расщепления хенодезоксихолево́й кислоты (Azfal *et al.*, 2011). Модификация генома этих бактерий может открыть новые возможности для развития биотехнологических процессов.

Бактерии рода *Geobacillus* ввиду своей способности использовать различные сахара и высокой скорости роста при повышенных температурах как в аэробных, так и в анаэробных условиях представляют особый интерес в качестве продуцентов спиртов из лигноцеллюлозной биомассы. Исследования в этом направлении проводятся достаточно давно. В частности, штамм *B. stearothermophilus* LLD-R, способный расти с высокой скоростью при 70 °С, при анаэробных условиях производит в основном L-лактат и небольшие количества муравьиной и уксусной кислот, а также спирта. Путем селекции резистентного штамма на среде с флуоропируватом был получен мутантный штамм LLD-15, у которого ген L-лактатдегидрогеназы был инактивирован (Payton, Hartley, 1985). Мутантный штамм *B. stearothermophilus* LLD-R был способен производить спирт из сахарозы при 70 °С с эффективностью и скоростью, сопоставимыми с таковыми для дрожжей, традиционно используемых для получения этанола из крахмала и сахарозы (Hartley, Shama, 1987).

***Geobacillus thermoglucosidasius*.** В другой работе была осуществлена попытка получения продуцента этанола из бактерии *G. thermoglucosidasius* путем введения в клетку гена пируватдекарбоксилазы из *Zyotomonas mobilis*. Эта стратегия показала свою эффективность в создании этаноногенных *Escherichia coli* (Ingram *et al.*, 1987; Alterthum, Ingram 1989) и *Bacillus megaterium* (Talarico *et al.*, 2005). Thompson с соавт. продемонстрировали, что пируватдекарбоксилаза из *Z. mobilis* может экспрессироваться в *G. thermoglucosidasius* в активной форме при температурах до 52 °С, что соответствует минимальной температуре роста этой бактерии. Хотя нативный фермент стабилен при температуре до 60 °С, сборка полноценной термостабильной пируватдекарбоксилазы в *G. thermoglucosidasius*

не происходила, что не позволило использовать полученный штамм в качестве продуцента этанола (Thompson *et al.*, 2008).

В 2009 г. Cripps с соавт. опубликовали статью, в которой исследовали возможность получения продуцентов спирта на основе бактерий *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955 и DL33 (Cripps *et al.*, 2009). Авторы разработали систему генетической инженерии для этих штаммов и смогли внести ряд изменений в их геном. Первоначально в геноме обоих штаммов был нокаутирован ген лактатдегидрогеназы. В случае *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955 доминирующим продуктом стал этанол с заметным количеством примеси муравьиной и уксусной кислот, выход этанола возрос с 0,10 г/г до 0,24 г/г глюкозы. Недостатком мутантной линии стало уменьшение скорости роста и, соответственно, переработки глюкозы; время достижения максимальной концентрации этанола возросло с 6,5 до 12,5 ч. В случае *G. thermoglucosidasius* DL33 также наблюдалось заметное увеличение выхода этанола (до 0,31–0,35 г/г глюкозы) с примесью муравьиной и уксусной кислот.

Для дальнейшей работы авторы выбрали штамм *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955. Было показано, что лимитирующим звеном является переработка пирувата до ацетил-КоА. В связи с чем для ускорения этого процесса была проведена замена нативного промотора гена *pdhA* (пируват дегидрогеназы α) на промоторы генов *ldh* (лактат дегидрогеназы), взятых из геномов других штаммов бактерий этого же рода, а также на промотор гена *pfl* (пируватформиатлиазы) *B. cereus* ATCC14579. Во всех случаях было достигнуто заметное увеличение выхода этанола. Для снижения количества примесей в виде формиата и исключения его влияния на клетки авторы провели нокаут гена пируватформиатлиазы *pfl*. В результате в конечном продукте содержание муравьиной кислоты снизилось практически до нуля. Эта работа была выполнена на основании ранее проведенных исследований *G. thermoglucosidasius* M10EXG.

G. thermoglucosidasius M10EXG был выделен путем скрининга в компостных отложениях термофильных микроорганизмов, способных жить при высоких концентрациях спирта (Fong *et al.*, 2006). Выявленным в результате скрининга двум новым штаммам были даны названия

G. thermoglucosidasius M5EXG и M10EXG, что отражает их толерантность к спирту в концентрациях 5 и 10 % (об./об.) соответственно. Эти штаммы способны расти в диапазоне температур 50–80 °С и pH 6,0–8,0, оба штамма могут использовать различные источники углерода, включая арабинозу, галактозу, маннозу, глюкозу и ксилозу, и продуцируют небольшие количества спирта, ацетата и лактата.

Исследования профиля роста *G. thermoglucosidasius* M10EXG на различных питательных средах показали, что этот штамм способен расти на минимальной среде, содержащей глюкозу или ксилозу в качестве единственного источника углерода. *G. thermoglucosidasius* M10EXG может использовать глюкозу и ксилозу одновременно (совместное брожение), хотя при относительно низкой концентрации глюкозы потребление ксилозы снижается, особенно при добавлении дрожжевого экстракта в среду (Riyanti *et al.*, 2009). Самый высокий выход биомассы (0,5 г/л) был получен на среде с глюкозой, выход возрастал при добавлении дрожжевого экстракта. Самая высокая удельная скорость роста была получена при выращивании штамма на смеси глюкозы и ксилозы (0,5 %: 0,5 % вес/объем). Диауксический рост был показан на смеси глюкозы, ксилозы и дрожжевого экстракта. Штамм производит этанол (0,1 г/л), а также (0,2 г/л) побочные продукты, L-лактат и ацетат, после 15 ч роста.

Исследования центрального метаболизма *G. thermoglucosidasius* M10EXG при различных условиях роста показали, что при аэробных условиях метаболизм глюкозы протекает через гликолиз, пентозофосфатный путь и цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Когда условия роста были переведены с аэробных на микроаэробные, потоки углерода в ЦТК и пентозофосфатном пути сократились примерно в два раза и были направлены на производство этанола, L-лактата (> 99 % оптической чистоты), ацетата и формата. При полностью анаэробных условиях *G. thermoglucosidasius* M10EXG использовал смешанный процесс брожения и давал максимальный выход этанола: $0,38 \pm 0,07$ моль на 1 моль глюкозы. Применение моделирования потоков углерода *G. thermoglucosidasius* M10EXG *in silico* показало, что для повышения производства этанола необходимо модифицировать мета-

болические пути, поскольку продукция лактата и ацетата уменьшает максимальный выход этанола примерно в 3 раза (Tang *et al.*, 2009).

Работу со штаммом *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955 продолжил Bartosiak-Jentys с соавт. Эти исследования были направлены на возможность использования этого штамма в качестве продуцента белков. Авторы разработали вектор для экспрессии и секреции гетерологических белков в *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955 (Bartosiak-Jentys *et al.*, 2013). Этот вектор (pUCG3.8) содержал ген устойчивости к канамицину (*knt*) и полилинкер, включающий различные сайты рестрикции. В полученную конструкцию был встроен ген эндоглюканазы Cel5A *Thermotoga maritima* под промотором гена β -глюкозидазы *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955. С 3'-конца гена эндоглюканазы была помещена последовательность, кодирующая сигнальный пептид β -1,4-ксиланазы *G. thermoglucosidasius* C56-YS93. Было показано, что промотор β -глюкозидазы успешно индуцируется целлобиозой и обеспечивает высокий уровень экспрессии белка.

Авторы также сделали попытку экспрессировать в pUCG3.8 укороченный ген *celA* *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, содержащий экзоглюканазный домен семейства 48 гликозидгидролаз и С-терминальный углевод-связывающий домен. В результате был достигнут лишь незначительный уровень специфической активности, что говорит или о слабой работе промотора, или о слабой секреции белка.

Так как уровень экспрессии генов под промотором β -глюкозидазы оказался неустойчивым из-за постепенного уменьшения количества целлобиозы, авторы заменили его на модифицированный конститутивный промотор гена урацилфосфорибозилтрансферазы *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955. В результате уровень экспрессии белка Cel5A вырос в 5 раз по сравнению с экспрессией под промотором β -галактозидазы.

МЕТОДЫ ТРАНСФОРМАЦИИ *GEOBACILLUS*

Возможность проведения манипуляций с геномом клетки открывает широкие перспективы для получения эффективных продуцентов

на основе выделенных из природы бактерий. Ключевым этапом в манипуляции с геномом микроорганизма является его трансфекция экзогенной ДНК. Для бактерий рода *Geobacillus* удалось трансформировать очень ограниченный круг штаммов, в большинстве случаев с применением достаточно сложных методов, в связи с чем данный вопрос требует отдельного, внимательного рассмотрения. За время изучения этого вопроса было опробовано достаточно большое число методов трансфекции *Geobacillus* spp.

Трансфекция протопластов

Первые работы по трансформации бактерий, отнесенных в настоящее время к роду *Geobacillus*, появились в 1980-х годах. Трансформация *B. stearothermophilus* CU21 была проведена коллективом японских авторов с применением методики трансформации протопласта в присутствии полиэтиленгликоля, описанной для *Bacillus subtilis* (Chang, Cohen, 1979), с некоторыми модификациями, учитывающими специфику роста термофильной бактерии (Imanaka *et al.*, 1982). Максимальная эффективность этой процедуры составила 2×10^7 трансформантов на 1 мкг ДНК, при этом плазмиды рТВ19 и рТВ90 из термофильного *Bacillus* spp. могли поддерживаться и экспрессироваться в *B. stearothermophilus* до 65 °С, тогда как экспрессия рUB110 из мезофильного *Staphylococcus aureus* происходила при температурах до 55 °С.

Успешная трансформация протопластов другого штамма, *B. stearothermophilus* 1174, была проведена конструкцией, состоящей из термостабильного ориджина репликации плазмиды *B. stearothermophilus* и селективного маркера антибиотикоустойчивости из плазмиды рUB110 (Liao *et al.*, 1986). Химерная плаزمида была значительно более стабильна, чем рUB110, и поддерживалась при температуре до 70 °С, однако кодируемая плазмидой канамицин-нуклеотидилтрансфераза была неустойчива при температурах выше 55 °С. Исследователями был отобран мутантный вариант плазмиды, устойчивый к канамицину при температурах до 63 °С, и определены нуклеотидные замены, обеспечивающие термостабильность канамицин-нуклеотидилтрансферазы. Эффектив-

ность трансформации, достигнутая в данной работе, составила 4×10^4 трансформантов на мкг ДНК.

Эффективная система трансформации протопластов *B. stearothermophilus* NUB3621 плазмидой рТНТ15 Тсг, выделенной из термофильного *Bacillus* spp., и рLW05 Сmg, сконструированной на основе плазмиды рUB110 из мезофильного *S. aureus*, была разработана Wu и Welker (1989). Эффективность трансформации этими плазмидами составила 4×10^8 и 2×10^7 трансформантов на мкг ДНК соответственно, что выше, чем для *B. stearothermophilus* CU21 (Imanaka *et al.*, 1982) или *B. stearothermophilus* NRRL 1174 (Liao *et al.*, 1986). Трансформация проводилась при 50 °С, что близко к минимальной температуре роста этого штамма. Однако рLW05 Сmg не могла стабильно поддерживаться при температурах свыше 50 °С, хотя белок, кодируемый геном антибиотикоустойчивости, был активен до 70 °С. Напротив, рТНТ15 Тсг была стабильна в культурах, растущих при температурах более 60 °С, но белок, обеспечивающий устойчивость к тетрациклину, был относительно термолabileм при повышенных температурах.

Электропорация

Одной из первых работ, в которой был описан метод электропорации *B. stearothermophilus*, стала работа Narumi с соавт., которые выделили из образцов почвы штаммы *B. stearothermophilus* и провели скрининг на эффективность электропорации (Narumi *et al.*, 1992). В результате был выделен штамм *B. stearothermophilus* K1041, для которого провели оптимизацию условий электропорации, в результате чего эффективность этой процедуры сравнялась с эффективностью трансформации протопластов *B. stearothermophilus* CU21 плазмидой рUB110 (Imanaka *et al.*, 1982). Эффективность трансформации была максимальна для клеток, находящихся в поздней экспоненциальной фазе роста при $OD_{600} = 0,95$, и составила $5,8 \times 10^5$ на мкг рUB110. При этих условиях и трансформации рекомбинантной плазмидой рIH41, кодирующей устойчивость к хлорамфениколу, тетрациклину и канамицину, эффективность процедуры немного снижалась и составила 10^4 – 10^5 на мкг рIH41.

Конъюгация

Метод трансформации при помощи конъюгации широко используется для трансформации актиномицетов. Этот подход был использован Suzuki с соавт. для трансформации бактерий рода *Geobacillus* (Suzuki, Yoshida, 2012). Культуру термостабильных бактерий, в данном случае *G. kaustophilus*, легко отделить от клеток *E. coli* инкубированием при высокой температуре, что очень удобно при использовании метода.

Suzuki с соавт. описали способы трансформации бактерий *G. kaustophilus* (Suzuki, Yoshida, 2012; Suzuki *et al.*, 2012, 2013). Штамм *G. kaustophilus* HTA426 был выделен из глубоководных отложений Марианской впадины, он способен к росту в аэробных условиях при высоких температурах (40–74 °C) и высокой концентрации NaCl – до 3 % w/v (Takami *et al.*, 2004a). Этот штамм имеет высокую скорость роста при аэробных и анаэробных условиях, сходную с таковой для *E. coli* и *B. subtilis*, и способен использовать в качестве источника углерода широкий спектр веществ: глицерин, казаминовые кислоты, гексозы (D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, миоинозитол), пентозы (L-арабиноза и D-ксилоза), олигосахариды (целлобиоза, мальтоза, сахароза, растворимый крахмал, ксилоолигосахариды) и спирты (этанол, 2-пропанол, н-бутанол).

Значительное влияние на эффективность трансформации могут оказывать системы рестрикции–модификации (R-M). Для преодоления рестрикционного барьера могут быть использованы методы метилирования плазмидной ДНК либо *in vitro*, либо *in vivo*. Получение системы метилирования требует знания последовательностей ключевых ферментов. Для штамма *G. kaustophilus* HTA426 известна полная последовательность генома (Takami *et al.*, 2004b). Анализ генома *G. kaustophilus* HTA426 показал, что у этого вида имеются два набора генов системы R-M типа I: GK0343 (M subunit) – GK0344 (S subunit) – GK0346 (R subunit) и GK1380 (M subunit) – GK1381 (S subunit) – GK1382 (R subunit), а также три гена системы R-M типа IV (GK1378, GK1379 и GK1390). Кроме того, плаزمида pHTA426, присутствующая в клетках этого штамма, имеет один набор генов системы R-M типа II: GKP09 (эндонуклеаза) – GKP08

(метилаза). На основании полученных данных были разработаны плазмиды, содержащие гены *G. kaustophilus* HTA426 GK0343 (M-субъединица) – GK0344 (S-субъединица) и GK1380 (M-субъединица) – GK1381 (S-субъединица) под контролем промотора гена *hsp90*. Гены *G. kaustophilus*, встроенные в эти плазмиды, успешно метилировали ДНК *E. coli*. В результате экспрессии в клетках *E. coli* белков системы метилирования *G. kaustophilus* HTA426 ДНК, содержащаяся в штамме, имела тот же профиль метилирования, что и геном *G. kaustophilus*. В результате конъюгации с применением штамма *E. coli*, имеющего профиль метилирования, аналогичный профилю метилирования штамма реципиента, удалось получить очень высокий уровень трансформации с использованием плазмиды pUCG18t.

После того как была получена эффективная методика трансфекции *G. kaustophilus* HTA426, была создана система для модификации генома этой бактерии с последующим удалением маркерных генов (Suzuki *et al.*, 2012b). Была использована широко применяемая в молекулярной биологии система положительного и отрицательного отбора, основанная на использовании ауксотрофии по урацилу. Ген *pyrF* кодирует оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу. Этот фермент также переводит 5-флуорооротат в токсичный 5-флуороуридин-5'-монофосфат. Мутанты с делецией по гену *pyrF* не способны расти на среде, не содержащей урацил, однако устойчивы к присутствию 5-флуорооротата.

При использовании этой системы селекции авторам удалось получить генетически модифицированные штаммы *G. kaustophilus*, содержащие встройки генов *bgaB* (кодирует β -галактозидазу) и *amyE* (кодирует α -амилазу). Продукты этих генов позволяют быстро детектировать наличие гетерологичной встройки. Та же группа авторов (Suzuki *et al.*, 2013) идентифицировала в геноме *G. kaustophilus* HTA426 ряд промоторов, индуцируемых мальтозой, D-галактозой, целлобиозой, L-арабинозой и миоинозитолом, и показала их способность успешно активировать гетерологичный ген β -галактозидазы. При помощи вышеописанной системы для модификации генома авторы смогли встроить в геном *G. kaustophilus* HTA426 несколько гетерологичных генов: α -амилазу *G. stearothermophilus*,

предполагаемую NTP-трансферазу и фрагменты гена целлюлазы *Pyrobaculum horikoshii*, эстеразу *Pyrobaculum calidifontis*, D-лактатдегидрогеназу *Sulfolobus tokodaii* и предполагаемую азоредуктазу *G. kaustophilus*.

ПЛАЗМИДЫ И ЧЕЛНОЧНЫЕ ВЕКТОРА ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ В *GEOBACILLUS*

Плазмида pUB110 наиболее широко используется для трансфекции бактерий рода *Geobacillus* и других термофильных бактерий типа *Vacilli*. На его основе было создано несколько векторов, несущих ориджин репликации pUB110 и ген устойчивости к канамицину.

В частности, благодаря использованию таких векторов коллективу во главе с R. Striggs удалось получить стабильные генетически модифицированные штаммы *G. thermoglucosidasius* (Striggs *et al.*, 2009). Было показано, что эти вектора не способны реплицироваться в *G. thermoglucosidasius* при температуре выше 65 °С. При этом наблюдалось большое количество случаев гомологичной рекомбинации между плазмидой и бактериальными хромосомами. Таким образом, встроенная в плазмиду нужная последовательность, фланкированная длинными (около 300 п.н.) фрагментами, идентичными последовательностям бактериального генома, интегрировалась в нуклеоид *G. thermoglucosidasius*. Колонии со встройками можно отбирать по фенотипу или методом полимеразной цепной реакции.

Другая векторная система была получена Nagumi с соавт. путем вставки фрагмента термофильной плазмиды pIH41, выделенной из *Bacillus* sp., в плазмиду pUC18. Челночный вектор pSTE12 благодаря термофильной вставке был способен реплицироваться в *B. stearothermophilus* K1041 и экспрессировал ген резистентности к тетрациклину. Вектор содержал 10 уникальных сайтов рестрикции из района *lacI'OPZ'* плазмиды pUC18. pSTE12 со встройкой фрагмента, кодирующего аспаргат транскарбамилазу *E. coli*, стабильно поддерживался в *B. stearothermophilus* K1041 при селективных условиях. Этот же коллектив авторов (Nagumi *et al.*, 1992) разработал термостабильный вектор pSTE33, который состоит из фрагмента плазмиды *E. coli* pUC19, гена, кодирующего термостабильную канамицин-нуклеотидилтрансферазу

из плазмиды pKM14, и фрагмента плазмиды pSTK1 *B. stearothermophilus*. Вектор стабильно поддерживался в *B. stearothermophilus* при 67 °С без снижения числа копий.

De Rossi с соавт. на основе маленькой криптической плазмиды из термофильного штамма *B. coagulans* Zu 196 I создали рекомбинантную плазмиду pRP9, содержащую ген устойчивости к хлорамфениколу. Полученная плазмида обладала высокой сегрегационной и структурной стабильностью в *B. stearothermophilus*. Эффективность трансформации *B. stearothermophilus* NUB3621 плазмидой pRP9 составила $4-6 \times 10^5$ на мкг ДНК. Было показано, что на неселективной среде плазмида стабильно поддерживается по крайней мере на протяжении 100 поколений (De Rossi *et al.*, 1991).

О создании челночного вектора для метаболической инженерии *Geobacillus* spp. сообщали Taylor с соавт. На основе плазмиды pUC19, гена устойчивости к канамицину из плазмиды pUB110 и маленькой криптической плазмиды pBST1 был создан вектор, названный pUCG18, который реплицировался в клетках *E. coli* и *G. thermoglucosidasius* DL44 и был стабильным до 68 °С в присутствии селективирующего агента. Эффективность трансформации *G. thermoglucosidasius* составила 1×10^4 на мкг ДНК (Taylor *et al.*, 2008).

На основе плазмиды pUCG18 Bartosiak-Jentys с соавт. создали систему для скринирования трансформантов *G. thermoglucosidasius*. С этой целью была сконструирована плазмида pGR002, содержащая ген катехол-2,3-диоксигеназы (*pheB*) под промотором гена лактатдегидрогеназы (*ldh*). Катехол-2,3-диоксигеназа катализирует расщепление катехольного ароматического кольца до полуальдегида 2-гидроксимуконной кислоты. Этот продукт имеет яркий желтый цвет, что позволяет использовать его как маркер. Было показано, что наиболее высокий уровень экспрессии катехол-2,3-диоксигеназы достигается в аэробных условиях, тогда как в анаэробных условиях специфической активности в клетках не наблюдается (Bartosiak-Jentys *et al.*, 2012). Позднее та же группа создала вектор для экспрессии и секреции гетерологичных белков в *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955. Этот вектор (pUCG3.8) содержал ген устойчивости к канамицину (*knt*) и полилинкер,

включающий различные сайты рестрикции. В полученную конструкцию был встроен ген эндоглюканазы Cel5A *T. maritima* под промотором гена β -глюкозидазы *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955. С 3'-конца гена эндоглюканазы был помещен сигнальный пептид β -1,4-ксилазазы *G. thermoglucosidasius* C56-YS93. Данная конструкция была клонирована в *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955. Было показано, что промотор β -глюкозидазы успешно индуцируется целлобиозой и обеспечивает высокий уровень экспрессии белка (Bartosiak-Jentys *et al.*, 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря своим свойствам бактерии рода *Geobacillus* находят применение в качестве клеточных катализаторов. Также в биотехнологии используют выделенные из них ферменты. Отдельный интерес представляет возможность получения спирта напрямую из лигноцеллюлозной биомассы с использованием бактерий рода *Geobacillus*. Однако для получения эффективных продуцентов необходимо ввести в геном бактерий значительное количество модификаций с целью как оптимизации метаболизма, так и создания в клетках способности к гидролизу лигноцеллюлозной биомассы. Эти задачи требуют наличия эффективной системы трансфекции и механизмов модификации генома бактерий. Еще в 1980-х годах были найдены вектора и гены устойчивости к антибиотикам, способные поддерживаться в клетках термофильных бактерий. Были найдены штаммы бактерий рода *Geobacillus*, которые удалось трансформировать плазмидными векторами. Однако большинство штаммов оказались неспособными к трансфекции, возможно, по причине наличия рестрикционного барьера, возможно, по другим, невыясненным пока причинам.

Таким образом, можно заключить, что в области изучения свойств бактерий рода *Geobacillus* имеется значительный потенциал для получения на их основе клеточных катализаторов при помощи методов направленной инженерии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 14.512.11.0057 Министерства образования и науки Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

- Abdel-Fattah Y.R., Gaballa A.A. Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli* // Microbiol. Res. 2008. V. 163. P. 13–20.
- Afzal M., Oommen S., Al-Awadi S. Transformation of chenodeoxycholic acid by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* // Biotechnol. Appl. Biochem. 2011. V. 58. P. 250–255.
- Alterthum F., Ingram L.O. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli* // Appl. Envir. Microbiol. 1989. V. 55. P. 1943–1948.
- Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S., Collins M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences // Lett. Appl. Microbiol. 1991. V. 13. P. 202–206.
- Assareh R., Shahbani Zahiri H., Akbari Noghahi K. *et al.* Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws // Biores. Technol. 2012. V. 120. P. 99–105.
- Balan A., Ibrahim D., Abdul Rahim R., Ahmad Rashid F.A. Purification and characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra // Enzyme Res. 2012. V. 2012. P. 987523.
- Banat I.M., Marchant R., Rahman T.J. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 2197–2201.
- Bartosiak-Jentys J., Eley K., Leak D.J. Application of pheB as a reporter gene for *Geobacillus* spp., enabling qualitative colony screening and quantitative analysis of promoter strength // Appl. Envir. Microbiol. 2012. V. 78. P. 5945–5947.
- Bartosiak-Jentys J., Hussein A.H., Lewis C.J., Leak D.J. Modular system for assessment of glycosyl hydrolase secretion in *Geobacillus thermoglucosidasius* // Microbiol. 2013. V. 159. P. 1267–1275.
- Ben-David A., Bravman T., Balazs Y.S. *et al.* Glycosynthase activity of *Geobacillus stearothermophilus* GH52 beta-xylosidase: efficient synthesis of xylooligosaccharides from alpha-D-xylopyranosyl fluoride through a conjugated reaction // Eur. J. Chem. Biol. 2007. V. 8. P. 2145–2151.
- Canakci S., Inan K., Kacagan M., Belduz A.O. Evaluation of arabinofuranosidase and xylanase activities of *Geobacillus* spp. isolated from some hot springs in Turkey // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 17. P. 1262–1270.
- Canakci S., Cevher Z., Inan K. *et al.* Cloning, purification and characterization of an alkali-stable endoxylanase from thermophilic *Geobacillus* sp. 71 // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. P. 1981–1988.
- Chang S., Cohen S.N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA // Mol. Gen. Genet. 1979. V. 168. P. 111–115.
- Cheong K.W., Leow T.C., Rahman R.N.Z.R.A. *et al.* Reductive alkylation causes the formation of a molten globule-like intermediate structure in *Geobacillus zalihae* strain T1 thermostable lipase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 164. P. 362–375.
- Coorevits A., Logan N.A., Dinsdale A.E. *et al.* *Bacillus thermolactis* sp. nov., isolated from dairy farms, and emended

- description of *Bacillus thermoamylovorans* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 1954–1961.
- Cripps R.E., Eley K., Leak D.J. *et al.* Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production // Metab. Eng. 2009. V. 11. P. 398–408.
- De Benedetti E.C., Rivero C.W., Britos C.N. *et al.* Biotransformation of 2,6-diaminopurine nucleosides by immobilized *Geobacillus stearothermophilus* // Biotechnol. Progr. 2012. V. 28. P. 1251–1256.
- De Rossi E., Brigidi P., Rossi M. *et al.* Characterization of gram-positive broad host-range plasmids carrying a thermophilic replicon // Res. Microbiol. 1991. V. 142. P. 389–396.
- Dinsdale A.E., Halket G., Coorevits A. *et al.* Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenulatus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 1802–1810.
- Donk P.J. A highly resistant thermophilic organism // J. Bacteriol. 1920. V. 5. P. 373–374.
- Ebrahimpour A., Rahman R.N., Basri M., Salleh A.B. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM // Biores. Technol. 2011. V. 102. P. 6972–6981.
- Fong J.C.N., Svenson C.J., Nakasugi K. *et al.* Isolation and characterization of two novel ethanol-tolerant facultative-anaerobic thermophilic bacteria strains from waste compost // Extremophiles. 2006. V. 10. P. 363–372.
- Fortina M.G., Mora D., Schumann P. *et al.* Reclassification of *Saccharococcus caldoylosilyticus* as *Geobacillus caldoylosilyticus* (Ahmad *et al.* 2000) comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 2063–2071.
- Gerasimova J., Kuisiene N. Characterization of the novel xylanase from the thermophilic *Geobacillus thermodenitrificans* JK1 // Mikrobiologija. 2012. V. 81. P. 457–463.
- Goh K.M., Kahar U.M., Chai Y.Y. *et al.* Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. P. 1475–1488.
- Gordon R.E., Smith N.R. Aerobic sporeforming bacteria capable of growth at high temperatures // J. Bacteriol. 1949. V. 58. P. 327–341.
- Hartley B.S., Shama G. Novel ethanol fermentations from sugar cane and straw // Phil. Trans. Royal Soc. A. 1987. V. 321. P. 555–568.
- Imanaka T., Fujii M., Aramori I., Aiba S. Transformation of *Bacillus stearothermophilus* with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1982. V. 149. P. 824–830.
- Ingram L.O., Conway T., Clark D.P. *et al.* Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli* // Appl. Envir. Microbiol. 1987. V. 53. P. 2420–2425.
- Kuisiene N., Raugalas J., Chitavichius D. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1991–1995.
- Liao H., McKenzie T., Hageman R. Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 576–580.
- Liu B., Zhang N., Zhao C. *et al.* Characterization of a recombinant thermostable xylanase from hot spring thermophilic *Geobacillus* sp. TC-W7 // J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 22. P. 1388–1394.
- Miñana-Galbis D., Pinzón D.L., Lorén J.G. *et al.* Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz *et al.*, 1988) Banat *et al.* 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 1600–1604.
- Narumi I., Sawakami K., Nakamoto S. *et al.* A newly isolated *Bacillus stearothermophilus* K1041 and its transformation by electroporation // Biotechnol. Techn. 1992. V. 6. P. 83–86.
- Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B. *et al.* Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 433–446.
- Nazina T.N., Lebedeva E.V., Poltarau A.B. *et al.* *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 2019–2024.
- Ng I.-S., Li C.-W., Yeh Y.-F. *et al.* A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures // Extremophiles. 2009. V. 13. P. 425–435.
- Payton M.A., Hartley B.S. Mutants of *Bacillus stearothermophilus* lacking NAD-linked l-lactate dehydrogenase // FEMS Microbiol. Lett. 1985. V. 26. P. 333–336.
- Quintana-Castro R., Díaz P., Valerio-Alfaro G. *et al.* Gene cloning, expression, and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic lipase // Mol. Biotechnol. 2009. V. 42. P. 75–83.
- Ratnadewi A.A.I., Fanani M., Kurniasih S.D. *et al.* β -D-Xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08: biochemical characterization and bioinformatics of the enzyme // Appl. Biochem. Biotechnol. 2013. V. 170. No. 8. P. 1950–1964.
- Riyanti E.I., Rogers P.L. Kinetic evaluation of ethanol-tolerant thermophile *Geobacillus thermoglucosidasius* M10exg for ethanol production // Indones. J. Agric. Sci. 2009. V. 10. No. 1. P. 34–41.
- Shallom D., Leon M., Bravman T. *et al.* Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43 beta-D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6 // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 387–397.
- Sung M.H., Kim H., Bae J.W. *et al.* *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 2251–2255.
- Suzuki H., Yoshida K.-I. Genetic transformation of *Geobacillus kaustophilus* HTA426 by conjugative transfer of host-mimicking plasmids // J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 22. P. 1279–1287.
- Suzuki H., Murakami A., Yoshida K.-I. Counterselection system for *Geobacillus kaustophilus* HTA426 through disruption of *pyrF* and *pyrR* // Appl. Envir. Microbiol. 2012. V. 78. P. 7376–7383.
- Suzuki H., Yoshida K.-I., Ohshima T. Polysaccharide-degrading thermophiles generated by heterologous gene expres-

- sion in *Geobacillus kaustophilus* HTA426 // Appl. Envir. Microbiol. 2013. V. 79. P. 5151–5158.
- Takami H., Nishi S., Lu J. *et al.* Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench // Extremophiles. 2004a. V. 8. P. 351–356.
- Takami H., Takaki Y., Chee G.-J. *et al.* Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus* // Nucl. Acids Res. 2004b. V. 32. P. 6292–6303.
- Talarico L.A., Gil M.A., Yomano L.P. *et al.* Construction and expression of an ethanol production operon in Gram-positive bacteria // Microbiol. 2005. V. 151. P. 4023–4031.
- Tang Y.J., Sapra R., Joyner D. *et al.* Analysis of metabolic pathways and fluxes in a newly discovered thermophilic and ethanol-tolerant *Geobacillus* strain // Biotechnol. Bioeng. 2009. V. 102. P. 1377–1386.
- Taylor M.P., Esteban C.D., Leak D.J. Development of a versatile shuttle vector for gene expression in *Geobacillus* spp. // Plasmid. 2008. V. 60. P. 45–52.
- Taylor M.P., Eley K.L., Martin S. *et al.* Thermophilic ethanologenesis: future prospects for second-generation bioethanol production // Trends Biotechnol. 2009. V. 27. P. 398–405.
- Thompson A.H., Studholme D.J., Green E.M., Leak D.J. Heterologous expression of pyruvate decarboxylase in *Geobacillus thermoglucosidasius* // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. P. 1359–1365.
- Verhaart M.R.A., Bielen A.A.M., van der Oost J. *et al.* Hydrogen production by hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria and archaea: mechanisms for reductant disposal // Env. Technol. 2010. V. 31. P. 993–1003.
- Verma D., Anand A., Satyanarayana T. Thermostable and alkalistable endoxylanase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1: cloning, expression, characteristics and its applicability in generating xylooligosaccharides and fermentable sugars // Appl. Biochem. Biotechnol. 2013. V. 170. P. 119–130.
- Wagschal K., Heng C., Lee C.C. *et al.* Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 43 beta-xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. V. 155. P. 304–313.
- White D., Sharp R.J., Priest F.G. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area // Antonie van Leeuwenhoek. 1993. V. 64. P. 357–386.
- Woese C.R., Fox G.E., Zablen L. *et al.* Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA // Nature. 1975. V. 254. P. 83–86.
- Wu L.J., Welker N.E. Protoplast transformation of *Bacillus stearothersophilus* NUB36 by plasmid DNA // J. General Microbiol. 1989. V. 135. P. 1315–1324.
- Wu S., Liu B., Zhang X. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 1210–1216.
- Xiao Z., Wang X., Huang Y. *et al.* Thermophilic fermentation of acetoin and 2,3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain // Biotechnol. Biofuels. 2012. V. 5. P. 88.

THE CURRENT STATE OF GENETIC AND METABOLIC ENGINEERING OF *GEOBACILLUS* BACTERIA AIMED AT THE PRODUCTION OF ETHANOL AND ORGANIC ACIDS

A.S. Rozanov, I.A. Meshcheryakova, S.V. Shekhovtsov, S.E. Peltek

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: miren@bionet.nsc.ru

Summary

Thermophilic bacteria are extensively used in biotechnology. Species of the genus *Geobacillus* rank among the most promising ones. Current methods of the genetic and metabolic engineering of these microorganisms are considered. Examples of their use in various branches of biotechnology are presented.

Key words: *Geobacillus*, thermophiles, biotechnology, genetic engineering.