

ISSN 2224-5227

2016 • 2

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
БАЯНДАМАЛАРЫ

ДОКЛАДЫ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

REPORTS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ЖУРНАЛ 1944 ЖЫЛДАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ЖУРНАЛ ИЗДАЕТСЯ С 1944 г.
PUBLISHED SINCE 1944



Бас редактор
ҚР ҰҒА академигі **М.Ж. Жұрынов**

Редакция алқасы:

хим.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Әдекенов С.М.** (бас редактордың орынбасары), эк.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Әділов Ж.М.**, мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Арзықұлов Ж.А.**, техн. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Бишімбаев У.К.**, а.-ш.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Есполов Т.И.**, техн. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Мұтанов Г.М.**, физ.-мат.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Өтелбаев М.О.**, пед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Пралиев С.Ж.**, геогр.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Северский И.В.**; тарих.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Сыдықов Е.Б.**, физ.-мат.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Тәкібаев Н.Ж.**, физ.-мат.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Харин С.Н.**, тарих ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Әбүсейітова М.Х.**, экон. ғ. докторы, проф., ҰҒА корр. мүшесі **Бейсембетов И.К.**, биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**, тарих ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Кәрібаев Б.Б.**, мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**, геол.-мин. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Өмірсеріков М.Ш.**, физ.-мат. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рамазанов Т.С.**, физ.-мат. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Садыбеков М.А.**, хим.ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Сатаев М.И.**; ҚР ҰҒА құрметті мүшесі, а.-ш.ғ. докторы, проф. **Омбаев А.М.**

Редакция кеңесі:

Украинаның ҰҒА академигі **Гончарук В.В.** (Украина), Украинаның ҰҒА академигі **Неклюдов И.М.** (Украина), Беларусь Республикасының ҰҒА академигі **Гордиенко А.И.** (Беларусь), Молдова Республикасының ҰҒА академигі **Дука Г.** (Молдова), Тәжікстан Республикасының ҰҒА академигі **Илолов М.И.** (Тәжікстан), Қырғыз Республикасының ҰҒА академигі **Эркебаев А.Э.** (Қырғызстан), Ресей ҒА корр. мүшесі **Величкин В.И.** (Ресей Федерациясы); хим.ғ. докторы, профессор **Марек Сикорски** (Польша), тех.ғ. докторы, профессор **Потапов В.А.** (Украина), биол.ғ. докторы, профессор **Харун Парлар** (Германия), профессор **Гао Энджун** (КХР), филос. ғ. докторы, профессор **Стефано Перни** (Ұлыбритания), ғ. докторы, профессор **Богуслава Леска** (Польша), философия ғ. докторы, профессор **Полина Прокопович** (Ұлыбритания), профессор **Вуйцик Вольдемар** (Польша), профессор **Нур Изура Уздир** (Малайзия), д.х.н., профессор **Нараев В.Н.** (Ресей Федерациясы)

Главный редактор
академик НАН РК **М.Ж. Журинов**

Редакционная коллегия:

доктор хим. наук, проф., академик НАН РК **С.М. Адекенов** (заместитель главного редактора), доктор экон. наук, проф., академик НАН РК **Ж.М. Адилов**, доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Ж.А. Арзыкулов**, доктор техн. наук, проф., академик НАН РК **В.К. Бишимбаев**, доктор сельскохозяйств. наук, проф., академик НАН РК **Т.И. Есполов**, доктор техн. наук, проф., академик НАН РК **Г.М. Мутанов**, доктор физ.-мат. наук, проф., академик НАН РК **М.О. Отелбаев**, доктор пед. наук, проф., академик НАН РК **С.Ж. Пралиев**, доктор геогр. наук, проф., академик НАН РК **И.В. Северский**; доктор ист. наук, проф., академик НАН РК **Е.Б. Сыдыков**, доктор физ.-мат. наук, проф., академик НАН РК **Н.Ж. Такибаев**, доктор физ.-мат. наук, проф., академик НАН РК **С.Н. Харин**, доктор ист. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.Х. Абусейтова**, доктор экон. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **И.К. Бейсембетов**, доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**, доктор ист. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Б.Б. Карибаев**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**, доктор геол.-мин. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.Ш. Омирсериков**, доктор физ.-мат. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.С. Рамазанов**, доктор физ.-мат. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.А. Садыбеков**, доктор хим. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.И. Сатаев**; почетный член НАН РК, доктор сельскохозяйств. наук, проф., **А.М. Омбаев**

Редакционный совет:

академик НАН Украины **Гончарук В.В.** (Украина), академик НАН Украины **И.М. Неклюдов** (Украина), академик НАН Республики Беларусь **А.И.Гордиенко** (Беларусь), академик НАН Республики Молдова **Г. Дука** (Молдова), академик НАН Республики Таджикистан **М.И. Илолов** (Таджикистан), член-корреспондент РАН **Величкин В.И.** (Россия); академик НАН Кыргызской Республики **А.Э. Эркебаев** (Кыргызстан), д.х.н., профессор **Марек Сикорски** (Польша), д.т.н., профессор **В.А. Потапов** (Украина), д.б.н., профессор **Харун Парлар** (Германия), профессор **Гао Энджун** (КНР), доктор философии, профессор **Стефано Перни** (Великобритания), доктор наук, профессор **Богуслава Леска** (Польша), доктор философии, профессор **Полина Прокопович** (Великобритания), профессор **Вуйцик Вольдемар** (Польша), профессор **Нур Изура Удзир** (Малайзия), д.х.н., профессор **В.Н. Нараев** (Россия)

«Доклады Национальной академии наук Республики Казахстан» ISSN 2224-5227

Собственник: Республиканское общественное объединение «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5540-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год. Тираж: 2000 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г.Алматы, ул.Шевченко, 28, ком.218-220, тел. 272-13-19, 272-13-18

<http://nauka-nanrk.kz> reports-science.kz

Адрес типографии: ИП «Аруна», г.Алматы, ул.Муратбаева, 75

©Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016 г.

E d i t o r i n c h i e f

M.Zh. Zhurinov, academician of NAS RK

Editorial board:

S.M. Adekenov (deputy editor in chief), Doctor of Chemistry, prof., academician of NAS RK; **Zh.M. Adilov**, Doctor of Economics, prof., academician of NAS RK; **Zh.A. Arzykulov**, Doctor of Medicine, prof., academician of NAS RK; **V.K. Bishimbayev**, Doctor of Engineering, prof., academician of NAS RK; **T.I. Yespolov**, Doctor of Agriculture, prof., academician of NAS RK; **G.M. Mutanov**, Doctor of Physics and Mathematics, prof., academician of NAS RK; **M.O. Otelbayev**, Doctor of Physics and Mathematics, prof., academician of NAS RK; **S.Zh. Praliyev**, Doctor of Education, prof., academician of NAS RK; **I.V. Seversky**, Doctor of Geography, prof., academician of NAS RK; **Ye.B. Sydykov**, Doctor of Historical Sciences, prof., academician of NAS RK; **N.Zh. Takibayev**, Doctor of Physics and Mathematics, prof., academician of NAS RK; **S.N. Kharin**, Doctor of Physics and Mathematics, prof., academician of NAS RK; **M.Kh. Abuseitova**, Doctor of Historical Sciences, prof., corr. member of NAS RK; **I.K. Beisembetov**, Doctor of Economics, prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, Doctor of Biological Sciences, prof., corr. member of NAS RK; **B.B. Karibayev**, Doctor of Historical Sciences, prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, Doctor of Medicine, prof., corr. member of NAS RK; **M.Sh. Omirserikov**, Doctor of Geology and Mineralogy, prof., corr. member of NAS RK; **T.S. Ramazanov**, Doctor of Physics and Mathematics, prof., corr. member of NAS RK; **M.A. Sadybekov**, Doctor of Physics and Mathematics, prof., corr. member of NAS RK; **M.I. Satayev**, Doctor of Chemistry, prof., corr. member of NAS RK; **A.M. Ombayev**, Honorary Member of NAS RK, Doctor of Agriculture, prof.

Editorial staff:

V.V. Goncharuk, NAS Ukraine academician (Ukraine); **I.M. Neklyudov**, NAS Ukraine academician (Ukraine); **A.I. Gordienko**, NAS RB academician (Belarus); **G. Duca**, NAS Moldova academician (Moldova); **M.I. Iolov**, NAS Tajikistan academician (Tajikistan); **A.E. Erkebayev**, NAS Kyrgyzstan academician (Kyrgyzstan); **V.I. Velichkin**, RAS corr.member (Russia); **Marek Sikorski**, Doctor of Chemistry, prof. (Poland); **V.A. Potapov**, Doctor of Engineering, prof. (Ukraine); **Harun Parlar**, Doctor of Biological Sciences, prof. (Germany); **Gao Endzhun**, prof. (PRC); **Stefano Perni**, Doctor of Philosophy, prof. (UK); **Boguslava Leska**, dr, prof. (Poland); **Pauline Prokopovich**, Doctor of Philosophy, prof. (UK); **Wójcik Waldemar**, prof. (Poland), **Nur Izura Udzir**, prof. (Malaysia), **V.N. Narayev**, Doctor of Chemistry, prof. (Russia)

Reports of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

ISSN 2224-5227

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of Information and Archives of the Ministry of Culture and Information of the Republic of Kazakhstan N 5540-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 2000 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of.219-220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,

<http://nauka-nanrk.kz/> reports-science.kz

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 2224-5227

Volume 2, Number 306 (2016), 128 – 136

**THERMOASCUS AURANTIACUS B-GLUCOSIDASE
EXPRESSION IN S. CEREVISIAE**

Smekenov I.T.¹, Kuanbay A.K.², Buribaeva A.C.³, Taipakova S.M.⁴, Bissenbaev A.K.⁵.

Institute of Biology and Biotechnology Problems, al-Farabi Kazakh National University,
Almaty, Kazakhstan

Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Kew words: β -glucosidase, *Thermoascus aurantiacus*, *Saccharomyces cerevisiae* secretion, cellobiose, ethanol.

Abstract. By means of gene engineering methods, a recombinant plasmid YEGAp/alpha-bglI-flag was assembled. The vector carries β -glycosidase gene from *Thermoascus aurantiacus* with signal peptide of yeast α -factor and FLAG-tag. β -glycosidase cDNA was expressed in *S.cerevisiae* strain FF18733 under control of GAPDH promoter. The recombinant enzyme is secreted into culture medium and effectively digests cellobiose. Recombinant strain *S. cerevisiae* FF18733/YEGAp- α -bglI-flag is able to grow in medium where cellobiose acts as the only carbon source. The strain produces ethanol in cellobiose containing medium in quantities comparable to ethanol production by non-transformed yeast in medium with glucose.

УДК: 577.216.3, 577.218

**ЭКСПРЕССИЯ КДНК β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ
ГРИБА THERMOASCUS AURANTIACUS В S. CEREVISIAE**

Смекенов И.Т.¹, Куанбай А.К.², Бурибаева А.С.³, Тайпакова С.М.⁴, Бисенбаев А.К.⁵.

ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии»
КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Ключевые слова: β -глюкозидаза, *Thermoascus aurantiacus*, *Saccharomyces cerevisiae*, секрция, целлюлоза, этанол.

Аннотация. С помощью генно-инженерных методов сконструирована рекомбинантная плазмида YEGAp/alpha-bglI-flag, включающий ген β -глюкозидазы *bglI* гриба *Thermoascus aurantiacus* с сигнальным пептидом α -фактора дрожжей и flag-эпитопом. кДНК β -глюкозидазы экспрессирован под контролем конститутивного промотора GAPDH в *S. cerevisiae* штамма FF18733. Показано, что рекомбинантный фермент секретируется в культуральную среду и эффективно расщепляют целлюлозу. Показано, что рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* FF18733/YEGAp- α -bglI-flag обладает способностью к росту в среде с целлюлозой, добавленной в качестве единственного источника углеводов. Выявлено, что рекомбинантный штамм в среде с целлюлозой производит этанол сравнимый с количеством этанола производимыми нетрансформированными клетками дрожжей в среде с глюкозой.

Введение. Биологическая переработка целлюлозы является важным для развития альтернативной энергетики [1-5]. Целлюлоза является наиболее распространенным биологическим полимером. Она представляет собой линейный полимер, D-гликопиранозные остатки которого связаны β -1,4-глюкозидными связями. В зависимости от растительного источника степень полимеризации нативной целлюлозы может составлять приблизительно от 10 тыс. (у древесины) до 15 тыс. (у хлопка) [6]. Эффективная деструкция целлюлозы до растворимых сахаров, обычно требует совместное действие трех типов ферментов: эндо-1,4- β -глюконазы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4- β -глюконазы (КФ 3.2.1.91) и 1,4- β глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) [2-5]. Эндо-1,4- β -глюконазы

гидролизует внутренние β -1,4-гликозидные связи, экзо-1,4- β -глюкозидазы (целлобиогидролазы) отщепляют целлобиозу с конца полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы и в свою очередь β -глюкозидазы расщепляет целлобиозу до глюкозы [7-9]. Эти ферменты известны как целлюлазы, которые проявляют синергизм для полного гидролиза целлюлозы до растворимых олигомерных и мономерных сахаров.

В настоящее время в качестве возможных продуцентов целлюлаз рассматриваются широкий спектр организмов, включая бактерий, грибы, насекомые и растения [10-12].

Среди микробных продуцентов целлюлаз сумчатые грибы *Thermoascus aurantiacus* играют ведущую роль. Грибы *Thermoascus aurantiacus* секретируют сложный набор целлюлитических ферментов и являются источником коммерческих целлюлитических препаратов, особенно в пищевой, текстильной и фармацевтической промышленности [13,14].

β -1,4-гликозидаза является основным компонентом целлюлазного комплекса. Эффективность образования глюкозы из целлобиозы и их последующее ферментация в этанол зависит от β -1,4-гликозидазы. Однако, большая часть охарактеризованных β -1,4-гликозидаз сильно чувствительны к глюкозе, т. е. ингибируются конечным продуктом (глюкоза) по принципу обратной связи. В работе по биохимической характеристике β -1,4-гликозидаз грибов показано, что фермент, выделенный из *Thermoascus aurantiacus*, наибольшей эффективностью гидролизует целлобиозу и устойчив к действию глюкозы [15].

В настоящей работе ген β -1,4-гликозидазу *Thermoascus aurantiacus* (GenBank регистрационный номер DQ114397.1) клонирован под контроль конститутивного промотора глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*) и оптимизирована экспрессия этого гена в *S. cerevisiae*. Показано, что полученный рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* эффективно экспрессирует β -1,4-гликозидазу и ферментирует целлобиозу в этанол.

Материалы и методы

Материалы

Объектом исследования явились мицелии гриба *Thermoascus aurantiacus* семейства эуроциевых.

В ходе работы использовали клеточные линии: DH5 α для наработки плазмидной ДНК, экспрессионный штамм FF 18733 *S. cerevisiae*, а так же экспрессионный вектор YEGAp. Культивирование клеток *S. cerevisiae* проводили при 30°C в богатой среде YPAD, скрининг трансформантов проводили на синтетической минимальной селективной среде, включающей глюкозу и смеси аминокислот (среда SD DO -TRP). Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma», «Amresco», «Applichem» и «Реахим». А так же в ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (Германия), «New England Biolabs» (Франция), «Thermo Scientific» (Литва), «Promega» (США), «Roche» (США).

Таблица 1- Плазмиды использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
pMETalphaB	Сигнальный пептид (α -фактор)	Invitrogen
pBAD/gIII A	Мyc-эпитоп, 6xHis*tag	Invitrogen
YEGAp	pGAPDH, tGAPDH	[16]
pESC-LEU2	pGAL10	Agilent
YEGAp/ α -MCS-myc-6xHis		[17]

Электрофоретическое разделение белков в ДСН-ПААГ

Разделение белков по молекулярной массе проводили электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли в денатурирующих условиях [18].

Белковые образцы готовили кипячением в 2X буфере для образцов (2X:125мМ Tris-HCl pH

6,8, 10% β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0,02% бромфенолового синего, 20% глицерина) в течении 5 мин при 100°C. Далее 15 мкг образца белка нанесли на 5% концентрирующий гель и проводили концентрацию белков при 80V. Разделение белков осуществляли в 10% геле при 180V. В качестве электродного буфера использовали стандартный Трис-глицинный буфер pH 8,3 (25мМ Tris pH 8,3, 192мМ глицина, 0,1% SDS). После завершения электрофореза окрашивание гели проводили при комнатной температуре в растворе кумасси (50% метанол, 10% уксусная кислота, 0,25% Coomassie Blue R-250) в течении 1ч. Далее декантировали раствор для окрашивания и добавляли отмывочный раствор (10% метанол, 5% уксусная кислота). Гель отмывали, легко взбалтывая и помешивая жидкость до тех пор, пока зоны, свободные от белков, не станут прозрачными.

Методы определения активности ферментов

Трансформированные клетки культивировали в течение ночи в 20 мл минимальной селективной среды SD DO -TRP. Затем ночную культуру инокулировали в 1000 мл свежей среды и культивировали при 30 °C в течение 3 суток. Клетки собирали центрифугированием в течение 7 мин при 3000 x g, 20°C. Клетки ресуспендировали в 50мМ натрий-фосфатном буфере и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости с добавлением обработанной кислотой стеклянных бусинок диаметром 0,45мм. Клеточный лизат центрифугировали при 14000 x g в течение 30 мин. Культуральную жидкость использовали в качестве источника β-глюкозидазы. Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда [19], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Определение активности ферментов по отношению к n-нитрофенильным производным сахаров

Ферментативную активность по отношению к n-нитрофенильному производному сахаров n-нитрофенил β-D-целлобиозиду (pNP-Cell) определяли в pH-оптимуме действия фермента при концентрации субстрата 8мМ и оптимальной температуре. 400 мкл смеси, содержащего 50мМ натрий-фосфатного буфера с pH-оптимумом действия фермента, 8мМ pNP-Cell или pNP-Lac прогревали при оптимальной температуре в течении 5 мин, и далее ферментативную реакцию начинали путем внесения 0,1мл предварительно разбавленного и подогретого таким же образом раствора фермента. Инкубацию реакционной смеси проводили в течение 1 часа. Затем реакцию останавливали путем добавления 2 мл 1М Na₂CO₃. Поглощение раствора измеряли на спектрофотометре на длине волны 420 нм относительно контрольного раствора приготовленного таким же образом, но без фермента. Количество выделившегося n-нитрофенила рассчитывали с использованием его коэффициента экстинкции, и далее рассчитывали ферментативную активность. За единицу активности принимали количество фермента, которое приводит к образованию 1мкМ n-нитрофенола (pNP) из субстрата за 1мин на мг тотального белка при данных условиях реакции.

Определение выхода этанола

Для определения выхода этанола дрожжевые культуры были выращены в SD-Trp средах, содержащих 20 г/л глюкозы, 20 г/л целлобиозы или 20 г/л глюкозы + 20 г/л целлобиозы, в течение 5 дней в анаэробных условиях. Концентрацию этанола измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм каждые 12 часов с момента посева клеток. Изначально в кюветы залили 2 мл дистиллированной воды, сверху добавили 100 мкл образца, при этом каждый раз прикрывая кюветы крышками во избежание испарения этанола. После последовательно в каждую кювету залили по 200 мкл "solution 1 (buffer)", 200 мкл "solution 2 (NAD+)", 50 мкл "solution 3 (Aldehyde dehydrogenase)" и хорошо перемешав, инкубировали при 20-25°C приблизительно 2 минуты, после чего измеряли абсорбцию (A1). Получив значения A1, к реакционной смеси добавили второй фермент "suspension 4 (Alcohol dehydrogenase)", и хорошо перемешав, инкубировали при 20-25°C приблизительно 5-10 минут, после чего измеряли абсорбцию (A2). Полученные данные обрабатывали с помощью онлайн калькулятора Mega-CALC™.

Результаты и их обсуждения

Для выделения гена кодирующей β-1,4-гликозидазы *Thermoascus aurantiacus* нами были

конструированы две олигонуклеотидных праймера на основе данных о первичной структуре кДНК β -1,4-гликозидазы *T. aurantiacus*, имеющих в электронной базе данных GenBank (GenBank регистрационный номер DQ114397.1) [20]. Последовательности этих олигонуклеотидных праймеров следующее: смысловой праймер *bglI* Dir: 5'-aaAAGCTTCATATGAAGGATGACTTGGCC-3' и *bglI* Rev: 5'-aaGGATCCACTAGTCCGTAAGGGGAAGCGG-3'.

Подчеркнутые нуклеотиды соответствуют сайтам рестрикции *Hind*III, *Nde*I и *Bam*HI, *Spe*I, соответственно. В результате был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около 2500 п.н. ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами *Nde*I и *Bam*HI по фланкирующим ген сайтам рестрикции и клонировали в обработанный теми же рестриктазами вектор pET32a под контроль промотора бактериофага T7. Полученный рекомбинантный вектор - pET32a/*bglI* - трансформировали в *E.coli*. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Секвенирование нуклеотидной последовательности клонированного гена *bglI* показало полное совпадение с нуклеотидной последовательностью *bglI* *Thermoascus aurantiacus*, опубликованной ранее [20]. Для подтверждения того, что ген *bglI*, кодирует β -1,4-гликозидазу, мы использовали экспрессионный штамм *E.coli*. Rosetta(DE3). Экспрессию гена *bglI* в трансформированных клетках выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Данные ДСН-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой 96,9 кДа, что соответствует рассчитанной молекулярной массе BGL1. Аналогичная белковая полоса не обнаруживалась в экстрактах клеток, несущих pET32a без вставки.

Для создания дрожжевого интегрального вектора с промотором глицероальдегид-дифосфат дегидрогеназы (GAPD), сигнальным пептидом α -фактора дрожжей и гистидиновым тэгом нами были использованы несколько плазмидных векторов в качестве источников сигнального пептида, flag-эпитопа и 6xHis тэга (таблица 1). В первоначальных экспериментах мы клонировали кДНК ген *bglI* в плазмидный дрожжевой вектор pESC-LEU2 (рисунок 1). pESC-LEU2 вектор мы использовали в качестве источника flag-эпитопа. Для этого, плазмиду pET32a/*bglI* рестрицировали по сайту *Hind*III и обработали фрагментом Кленова для получения тупых концов. Затем полученный фрагмент кДНК гена *bglI* рестрицировали по сайту *Spe*I и клонировали в корпус вектора pESC-LEU2.

Необходимо отметить, что pESC-LEU2 вектор был предварительно рестрицирован по *Not*I и обработан фрагментом Кленова для получения тупого конца с одной стороны, с другой стороны рестрицирован по *Spe*I. В результате чего была получена рекомбинантная плаزمида pESC-LEU2/*bglI*-flag с кДНК геном *bglI* слитый с последовательностью flag-эпитопа на 3'-конце. Далее pESC-LEU2/*bglI*-flag обработали по сайтам рестрикции *Nde*I и *Pac*I и фрагмент длиной 2577 пар нуклеотидов, соответствующий длине кДНК *bglI* с последовательностью flag-эпитопа на 3'-конце, вырезали из агарозного геля, элюировали и лигировали в созданную нами YEGAp/ α -MCS-6xHis вектор, предварительно обработанной по тем же сайтам рестрикции (рисунок 1). Данный вектор содержит дрожжевой конститутивный промотор гена GAPDH. Кроме этого вектор YEGAp содержит ген *TRP1* для селекции трансформированных клеток, а также с сигнальный пептид α -фактора дрожжей и гистидиновый тэг (6xHis). Продукты лигирования были трансформированы в хемикомпетентные клетки *E.coli* штамма DH5 α .

Трансформированные клетки, несущие вектор со вставкой, были выявлены по устойчивости к ампицилину. Плазмидная ДНК, выделенная из отобранных клеток, была проверена на наличие вставки методом ПЦР и рестрикционного анализа. Результаты рестрикционного и ПЦР анализа плазмиды представлены на рисунке 2. Как видно из рисунка 2А, плазмиды выделенные из клеток *E. coli*, трансформированных рекомбинантным YEGAp/ α -*bglI*-flag, при обработке эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI и *Pac*I, на 0,8% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной 7 т.п.н. и 3 т.п.н.. Первая из полос соответствовала длине плазмиды YEGAp без вставки, а вторая длине рекомбинантной конструкции α -*bglI*-flag.

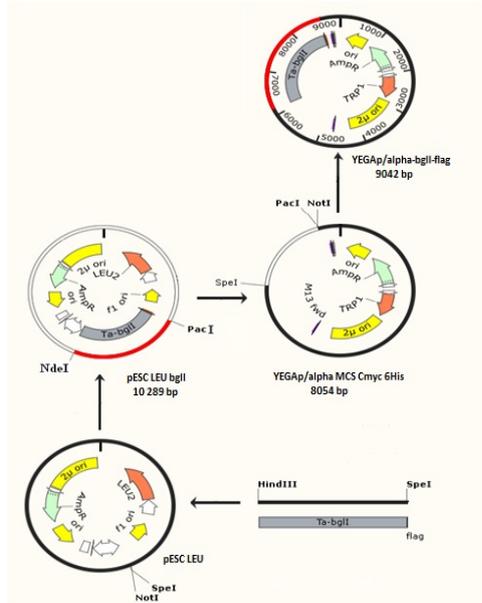
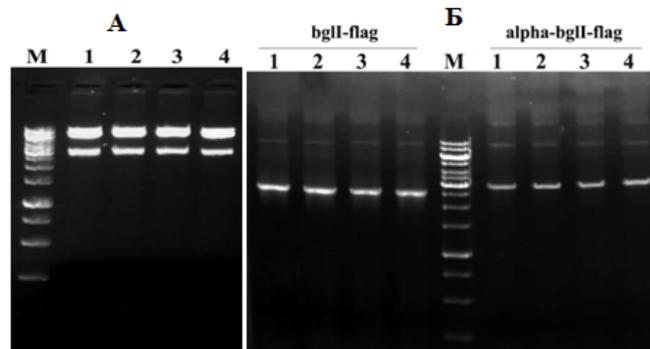


Рисунок 1 - Схема конструкции рекомбинантной плазмиды YEGAp/alpha-bglI-flag с кДНК геном *bglI* слитый с сигнальным пептидом α -фактора дрожжей и flag эпитопом

Также нами был проведен ПЦР анализ с использованием ген специфических праймеров и плазмидных ДНК, выделенных из трансформантов, в качестве матрицы. Фрагменты, обнаруженные в результате агарозного геля - электрофореза полностью соответствовали длине клонированного кДНК гена *bglI* и конструкции α -*bglI*-flag (рисунок 2Б)



А - Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды YEGAp/ α -*bglI*-flag; Б - ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды YEGAp/ α -*bglI*-flag. М- ДНК маркер; 1 - 4 клоны.
Рисунок 2 - Анализ клонов, трансформированных YEGAp/ α -*bglI*-flag штаммов *E. coli* на наличие рекомбинантной плазмиды

Таким образом, эти данные указывают на то, что проанализированные колонии содержат плазмиды, несущие соответствующую конструкцию. В результате проведенных анализов нами были идентифицированы четыре клоны, несущих рекомбинантную плазмиду. Вставленные фрагменты были проверены на отсутствие мутаций секвенированием.

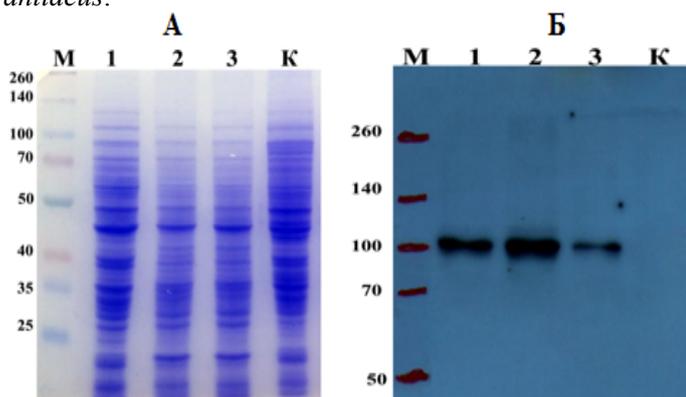
Несмотря на то, что последовательности аминокислот, установленные на основе нуклеотидной последовательности, полностью соответствовали клонированному нами *bglI* было необходимо продемонстрировать, кодирует ли на самом деле этот ген β -гликозидазу.

Для анализа экспрессии β -гликозидаз в дрожжевой системе под контролем конститутивного GAPD промотора, YEGAp/ α -*bglI*-flag вектор трансформировали в *S. cerevisiae* штамм FF 18733. Скрининг трансформантов проводили на селективной среде SD DO TRP supplement. В результате селекции было получено более двадцати колоний, из которых было отобрано три индивидуальных клонов. Отобранные трансформанты выращивали в 20 мл жидкой минимальной среды, в течение ночи при 30 °С. Ночную культуру переносили в большой объем минимальной среды и растили при

+30 °С в течение 72 часов.

Синтез рекомбинантных белков тестировали методом электрофореза в присутствии ДСН (рисунок 3). Для приготовления образцов дрожжевую массу лизировали на аппарате Omni Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer. Белковый экстракт получали центрифугированием лизата при 14000 об/мин в течении 40 мин, при температуре +4 °С. Для электрофоретического анализа использовали растворимые белки (супернатант). Результаты ДСН-ПААГ электрофореза показаны на рисунке 3А.

Данные ДСН-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой приблизительно 102 кДа в растворимой фракции. Однако с такой же молекулярной массой белковая полоса обнаруживалась в нетрансформированных клетках *S. cerevisiae*. Это указывает на то, что дрожжевые клетки содержат конститутивные белки с молекулярной массой аналогичной β -гликозидазе гриба *T. aurantiacus*.



А- ДСН-ПААГЭ белков *S. cerevisiae*, трансформированных YEGAp/ α -bglI-flag. Б- Вестерн блоттинг. М– Маркер; 1,3- клеточный экстракт *S. cerevisiae*, трансформированный YEGAp/ α -bglI-flag; К- клеточный экстракт *S. cerevisiae*, несущий пустой вектор YEGAp.

Рисунок 3 - Экспрессия кДНК гена BGL1 гриба *Thermoascus aurantiacus* в *Saccharomyces cerevisiae*

В последующих экспериментах для доказательства экспрессии рекомбинантного BGLI *T.aurantiacus* использовали иммуноблоттинг с антителами анти-flag. Для этого белки из ДСН-ПААГ перенесли на PVDF мембрану и инкубировали с анти-flag антителами. Иммуноблоттинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной массой около 100 kDa, следовательно, эти данные указывают на эффективную экспрессию рекомбинантных CEL7A и BGLI в *S. cerevisiae*.

Для выяснения способности сконструированного нами рекомбинантного штамма использовать целлобиозу в качестве источника энергии, конструированные нами штаммы дрожжей выращивали в среде, содержащей целлобиозу в качестве единственного источника углеводов. Для этого трансформированные клетки FF 18733-YEGAp/ α -bglI-flag методом штрихов посеяли на поверхность агаризованной минимальной среде с 2% целлобиозой. Результаты анализа приведены на рисунке 4. Как видно из рисунка клетки *S. cerevisiae* несущие рекомбинантную плазмиду YEGAp/ α -bglI-flag синтезируют и секретируют белки проявляющие активность против целлобиозы о котором можно судить по их способности к росту в среде с целлобиозой, тогда как клетки трансформированные пустым YEGAp вектором не имели таковых, что указывает на то, что они не секретируют белки обладающие β -гликозидазной активностью.



Рисунок 4 - Анализ секреции β -гликозидазы трансформированными клетками *S.cerevisiae* FF 18733-YEGAp-*alpha-bglI-flag*

Ферментативную активность по отношению к *n*-нитрофенильному производному сахаров *n*-нитрофенил β -D-целлобиозиду (pNP-Cell) определяли при pH-5 и оптимальной температуре 70°C, при концентрации субстрата 8мМ. В результате было показано, что рекомбинантный фермент BGLI может гидролизовать pNP-Cell ($21,8 \pm 1,02$ ед/мг белка), что свидетельствуют о том, что рекомбинантный фермент имеет целлобиазную активность.

На следующем этапе решили проверить будет ли созданный нами штамм дрожжей ферментировать целлобиозу в этанол. Продукцию этанола определяли путем посева рекомбинантных штаммов дрожжей с оптической плотностью при 600 нм (ОД600) между 1 и 2 единицами в 250 мл встряхиваемую колбу с 50 мл среды, которая содержала 20% целлобиозы и/или 20% глюкозу. Культуры инкубировали при 30°C и 220 об./мин и продукцию этанола определяли каждые 12 часов. Содержание этанола анализировали согласно протоколу набора «Ethanol Kit» от «Megazyme». Полученные данные указывают на то, что способность продуцировать этанол в обогащенной среде с целлобиозой, повышается по мере увеличения времени инкубации. Интересно отметить, выход этанола производимые рекомбинантными дрожжами в среде с целлобиозой были сравнимы с количеством этанола производимыми нетрансформированными клетками дрожжей в среде с 2% глюкозой.

Рекомбинантные дрожжи, выращенные в среде с целлобиозой после 72 часов продуцировали 8,5г этанола на литр. Тогда как нетрансформированные родительские штаммы дрожжей, выращенные в среде с глюкозой, продуцировали этанол в количестве 7г. этанола на 1литр. Кроме того, рекомбинантные штаммы, выращенные в среде, содержащей целлобиозу и глюкозу показали более высокий выход этанола (12 г/л).

Таким образом, в результате проведенных нами работ был получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* содержащий рекомбинантную YEGAp/*alpha-bglI-flag*, активно экспрессирующий и секретирующий рекомбинантную бета-глюкозидазу гриба *T. aurantiacus*, а также эффективный для ферментации целлобиозы в этанол.

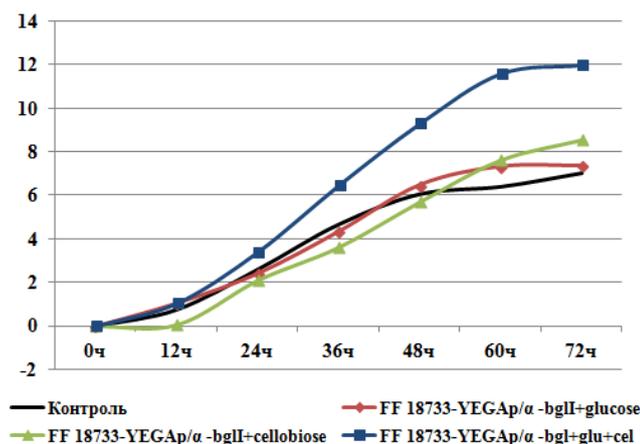


Рисунок 4- Определение выхода этанола во время ферментации субстрата рекомбинантным штаммом *S. cerevisiae* FF 18733-YEGAp/α-bglI-flag

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W., et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production // *Science*. -2007. -Vol.315, № 5813. -P. 804–807.
- [2] Birol F. World energy outlook 2010 // International Energy Agency. -2010.
- [3] Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K. Production of first and second-generation biofuels: a comprehensive review// *Renew Sustain Energy Rev*. -2010. -Vol.14, №2. -P.578-597.
- [4] Limayem A., Ricke S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects // *Prog. Energy Combust Sci*. - 2012. -Vol.38, №4. -P.449-467.
- [5] Mood S.H., Golfeshan A.H., Tabatabaei M., Jouzani G.S., Najafi G.H., Gholami M., et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment // *Renew Sustain Energy Rev*. -2013. -Vol.27. -P.77-93.
- [6] Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биооконверсия лигноцеллюлозных материалов. – М.: МГУ, 1995. - 224 с.
- [7] Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme// *Appl. Environ. Microbiol*. - 2004. -Vol.70. -P.1207-1212.
- [8] Turon X., Rojas O.J., Deinhammer R.S. Enzymatic kinetics of cellulose hydrolysis: a QCM-D study// *Langmuir*. - 2008. - Vol.24. -P.3880-3887.
- [9] Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G. Novel enzymes for the degradation of cellulose// *Biotechnol. Biofuels*. -2012. -Vol.5. -P.45.
- [10] Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology// *Microbiol Mol. Biol. R*. -2002. -Vol.66. -P.506-577.
- [11] Watanabe H., Tokuda G. Cellulolytic systems in insects // *Ann. Rev. Entomol*. -2010. -Vol.55. -P.609-632.
- [12] Hayashi T., Yoshida K., Park Y.W., Konishi T., et al. Cellulose metabolism in plants // *Int. Rev. Cytol*. -2005. - Vol.247. -P.1-34.
- [13] Bhat M.K., Parry N.J., Kalogiannis S., Beever D.E., Owen E., Nerinckx W., Claeysens M. Biochemical characterisation of cellulase and xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. In *Carbohydrases from T. reesei and Other Microorganisms: Structures, Biochemistry and Applications (Proceedings of the Tricel '97 Meeting)* (Claeysens, M., Nerinckx, W. and Piens, K., eds.)// Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K. -1998. -P.102–112.
- [14] McClendon S.D., Batth T., Petzold C.J., Adams P.D., Simmons B.A., Singer S.W. *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions// *Biotechnology for Biofuels*. -2012. - Vol.5. -P.54.
- [15] Cao L.-c.; Wang, Z.-j.; Ren, G.-h.; Kong, W.; Li, L.; Xie, W.; Liu, Y.-h. Engineering a novel glucose-tolerant β-glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration// *Biotechnology for Biofuels*. -2015. -Vol.8. -P.202.
- [16] Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-β-1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast// *J. Biosci. Bioeng*. -2001. -Vol.92. -P.434-441p.
- [17] Тайпакова С.М., Сметенов И.Т., Куанбай А.К., Бурибаева А.С., Бисенбаев А.К. Конструирование интегрального экспрессионного вектора направленный на *Ho* locus хромосомы дрожжей// *Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская*. -2016.
- [18] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// *Nature*. -1970. -Vol.227. -P.680-685.
- [19] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding//*Anal. Biochem*. -1976. -Vol.72. -P.248-252.

[20] Hong J., Tamaki H., Kumagai H. Cloning and functional expression of thermostable beta-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*// Appl Microbiol Biotechnol. -2007. -Vol.73, №6. -P.1331-1339.

REFERENCES

- [1] Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W., et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, **2007**, 315(5813), 804–807 (in Eng.).
- [2] Birol F. World energy outlook 2010. International Energy Agency, 2010 (in Eng.).
- [3] Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K. Production of first and second-generation biofuels: a comprehensive review. *Renew Sustain Energy Rev.*, **2010**, 14(2), 578–597 (in Eng.).
- [4] Limayem A., Ricke S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust Sci.*, **2012**, 38(4), 449–467 (in Eng.).
- [5] Mood S.H., Golfeshan A.H., Tabatabaei M., Jouzani G.S., Najafi G.H., Gholami M., et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sustain Energy Rev*, **2013**, 27, 77–93 (in Eng.).
- [6] Sinicyan A.P., Gusakov A.B., Chernoglazov V.M. Bioconversion of lignocellulosic materials. M.: MGU, **1995**, 224 p. (in Russ.).
- [7] Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, 70, 1207-1212 (in Eng.).
- [8] Turon X., Rojas O.J., Deinhammer R.S. Enzymatic kinetics of cellulose hydrolysis: a QCM-D study. *Langmuir*, **2008**, 24, 3880-3887 (in Eng.).
- [9] Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels*, **2012**, 5 (in Eng.).
- [10] Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol R*, **2002**, 66, 506-577 (in Eng.).
- [11] Watanabe H., Tokuda G. Cellulolytic systems in insects. *Ann. Rev. Entomol.*, **2010**, 55, 609-632 (in Eng.).
- [12] Hayashi T., Yoshida K., Park Y.W., Konishi T., et al. Cellulose metabolism in plants. *Int. Rev. Cytol.*, **2005**, 247, 1-34 (in Eng.).
- [13] Bhat M.K., Parry N.J., Kalogiannis S., Beever D.E., Owen E., Nerinckx W. and Claeysens M. Biochemical characterisation of cellulase and xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. In Carbohydrases from *T. reesei* and Other Microorganisms: Structures, Biochemistry and Applications (Proceedings of the Tricel '97 Meeting) (Claeysens, M., Nerinckx, W. and Piens, K., eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K., **1998**, 102–112 (in Eng.).
- [14] McClendon S.D., Bath T., Petzold C.J., Adams P.D., Simmons B.A., Singer S.W. *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions. *Biotechnology for Biofuels*, **2012**, 5, 54 (in Eng.).
- [15] Cao L.-c.; Wang, Z.-j.; Ren, G.-h.; Kong, W.; Li, L.; Xie, W.; Liu, Y.-h. Engineering a novel glucose-tolerant β -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. *Biotechnology for Biofuels*, **2015**, 8, 202 (in Eng.).
- [16] Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of a gene encoding a highly stable endo- β -1,4- β -glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 92, 434-441p. (in Eng.).
- [17] Taipakova S.M., Smeknov I.T., Kuanbay A.K., Bisenbaev A.C., Bissenbaev A.K. Construction of the integrated expression vector directed at the *HO* locus of yeast chromosome *News of the NAS RK*, series *biological and medical*, 2016 (in Russ.).
- [18] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-685 (in Eng.).
- [19] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248-252p. (in Eng.).
- [20] Hong J., Tamaki H., Kumagai H. Cloning and functional expression of thermostable beta-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **2007**, 73(6), 1331-1339 (in Eng.).

THERMOASCUS AURANTIACUS САҢЫРАУҚҰЛАҒЫНЫҢ β -ГЛЮКОЗИДАЗА КДНҚ-СЫНЫҢ S. CERVISIAE КЛЕТКАСЫНДА ЭКСПРЕССИЯСЫ

Смекенов И.Т.¹, Қуанбай А.К.², Бурибаева А.С.³, Тайпакова С.М.⁴, Бисенбаев А.К.⁵

ЕМК «Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты»

аль-Фараби ат. ҚазҰУ, Алматы, Қазақстан

Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Тірек сөздер: β -глюкозидаза, *Thermoascus aurantiacus*, *Saccharomyces cerevisiae*, целлобиоза, этанол.

Аннотация. Гендік инженерия әдістерінің көмегімен құрамында ашытқылар α -факторының сигнальды пептиді және flag-эпитобы бар *Thermoascus aurantiacus* саңырауқұлағының β -глюкозидаза *bglI* гені қосылған YEGAp/ α -*bglI*-flag рекомбинантты плазмидасы құрастырылды. β -глюкозидаза кДНҚсы *S. cerevisiae* FF18733 штаммында GAPDH конститутивті промоторы бақылауында экспрессияланды. Рекомбинантты ферменттің дақылдық ортаға секрецияланатындығы және целлобиозаны эффективті түрде ыдырата алатындығы көрсетілді. *S. cerevisiae* FF18733/YEGAp- α -*bglI*-flag рекомбинантты штаммы көмірсудің жалғыз көзі ретінде қосылған целлобиоза бар ортада өсуге қабілеттілігі көрсетілді. Рекомбинантты штамм целлобиоза қосылған ортада глюкозалы қоректік ортада дақылданған трансформацияланбаған ашытқы клеткаларымен шамалас мөлшерде этанол өндіретіндігі айқындалды.

Поступила 12.03.2016 г.

**PUBLICATION ETHICS AND PUBLICATION MALPRACTICE
IN THE JOURNALS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Cross Check <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

[www:nauka-nanrk.kz](http://www.nauka-nanrk.kz)

<http://www.reports-science.kz/index.php/ru/>

Редакторы *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов, Т.А. Апендиев*
Верстка на компьютере *С.К. Досаевой*

Подписано в печать 05.04.2016.

Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
14,25 п.л. Тираж 2000. Заказ 2.