

**Федеральное государственное учреждение**  
**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР**  
**«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»»**  
**РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**  
**(ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН)**

Индекс УДК  
Рег.№ НИОКТР  
Рег.№ ИКРБС  
Инв. №

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор  
ФИЦ Биотехнологии РАН  
д.б.н.

\_\_\_\_\_ А.Н.Федоров

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

**ОТЧЕТ**  
**О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**  
федерального проекта  
"Развитие масштабных научных и научно-технологических проектов по  
приоритетным исследовательским направлениям" национального проекта  
"Наука и университеты"  
по теме  
**«РАЗВИТИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ РЕШЕНИЯ  
ИННОВАЦИОННЫХ ЗАДАЧ ПРОМЫШЛЕННЫХ И ПИЩЕВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ»**

(промежуточный, этап 1)

Федеральной научно - технической программа  
развития генетических технологий на 2019 – 2027 годы

Соглашение № 075-15-2021-1071 от 28.09.2021

Руководитель НИР  
д.б.н.

\_\_\_\_\_ А.Н.Федоров

Москва 2021

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР, директор д.б.н., проф.	_____ 2021 г « ____ » _____	А.Н. Федоров (подготовка отчета)
Главный научный сотрудник, Академик РАН	_____ 2021 г « ____ » _____	М.П. Кирпичников (экспертиза отчета)
Заместитель директора к.б.н	_____ 2021 г « ____ » _____	А.М.Камионская (раздел 1.3)
Заведующий лабораторией с.н.с., к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	А.И.Александров (раздел 1.1, 1.2.3, 1.2.4, 1.2.14, 1.2.18, 1.2.19)
Заведующий лабораторией г.н.с., д.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	С.Н.Дедыш (раздел 1.2.9-1.2.12)
Заведующий лабораторией д.фарм.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	В.А.Макаров (раздел 1.2.14, 1.2.19)
Заведующий лабораторией д.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	Н.В.Пименов (раздел 1.2.9-1.2.12)
Заведующий лабораторией к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	М.С.Юркова (раздел 1.2.1, 1.2.2, 1.2.18, 1.2.13)
Профессор, д.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	Д.А.Долгих (раздел 1.2.1., 1.2.2)
Профессор, д.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	Н.В.Равин (раздел 1.2.3, 1.2.4)
Руководитель группы, в.н.с., к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	М.О.Агафонов (раздел 1.1, 1.2.3, 1.2.4, 1.2.14, 1.2.18, 1.2.19)
Ведущий научный сотрудник д.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____	В.В.Кушников (раздел 1.2.3., 1.2.4., 1.2.14, 1.2.13)

Старший научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	С.Ю.Бут (раздел 1.2.9-1.2.12)
Старший научный сотрудник к.х.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.П.Егорова (раздел 1.2.14, 1.2.19)
Старший научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.А.Иванова (раздел )
Старший научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	В.В.Кадников (раздел 1.2.3, 1.2.4)
Старший научный сотрудник к.х.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.В.Липкин (раздел 1.2.1, 1.2.2, 1.2.18, 1.2.13)
Старший научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	И.И.Мустахимов (раздел 1.2.9-1.2.12)
Старший научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	И.Ю.Ошкин (раздел 1.2.9-1.2.12)
Старший научный сотрудник к.х.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.М.Рожкова (раздел 1.2.5-1.2.8)
Старший научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	О.Н.Розова (раздел 1.2.13, 1.2.18)
Старший научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.Д.Сатрутдинов (раздел 1.2.6-1.2.8)
Старший научный сотрудник д.х.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.П.Синицын (раздел 1.2.4-1.2.8, 1.2.16, 1.2.17)
Научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	Ш.А.Бегматов (раздел 1.2.3, 1.2.4)
Научный сотрудник	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.В.Белецкий (раздел 1.2.3, 1.2.4)

Научный сотрудник	_____	И.Э.Грановский (раздел 1.2.1, 1.2.2)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.х.н.	_____	Ю.А.Денисенко (раздел раздел 1.2.6-1.2.8)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.х.н.	_____	А.С.Доценко (раздел раздел 1.2.5-1.2.6)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник	_____	В.А.Зенин (раздел 1.2.7)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.х.н.	_____	И.Н.Зоров (раздел 1.2.4-1.2.8, 1.2.16, 1.2.17)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.ф-м.н.	_____	Е.Г.Кондратьева (раздел 1.2.4)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.х.н.	_____	О.Г.Короткова (раздел )
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.б.н.	_____	Е.С.Марданова (раздел 1.2.3, 1.2.4)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.х.н.	_____	О.В.Митькевич (раздел раздел 1.1, 1.2.3, 1.2.4)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.х.н.	_____	Н.С.Монахова (раздел 1.2.14, 1.2.19)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.х.н.	_____	Е.Д.Никольская (раздел )
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.х.н.	_____	Д.О.Осипов (раздел 1.2.4-1.2.8)
« _____ » _____ 2021 г		
Научный сотрудник к.б.н.	_____	А.Л.Ракитин (раздел 1.2.3, 1.2.4)
« _____ » _____ 2021 г		



Научный сотрудник к.х.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	Е.А.Рубцова (раздел 1.2.5, 1.2.13)
Научный сотрудник к.х.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	О.Б.Рябова (раздел 1.2.14, 1.2.19)
Научный сотрудник к.х.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	Э.Г.Садыхов (раздел 1.1, 1.2.6)
Научный сотрудник к.х.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	М.В.Семенова (раздел 1.2.6)
Научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	В.Н.Ураков (раздел 1.2.4, 1.2.5)
Научный сотрудник	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.А.Филимоненков (раздел 1.1, 1.2.6)
Научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.М.Чулкин (раздел 1.2.6, 1.2.7)
Младший научный сотрудник	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.А.Галлямов (раздел 1.2.4, 1.2.5)
Младший научный сотрудник к.б.н.	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	Е.В.Груздев (раздел 1.2.1, 1.2.2, 1.2.13)
Младший научный сотрудник	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	Д.С.Калинин (раздел 1.2.5)
Младший научный сотрудник	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	А.В.Каргинов (раздел 1.2.14, 1.2.18, 1.2.19)
Младший научный сотрудник	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	В.Ю.Кислицин (раздел 1.2.4-1.2.8)
Младший научный сотрудник	_____ 2021 г « ____ » _____ 2021 г	К.К.Мирошников (раздел 1.1.2, 1.2.9)

Младший научный сотрудник	_____	И.Г.Синельников
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.4-1.2.8, 1.2.16, 1.2.17)
Младший научный сотрудник	_____	С.Н.Суанбекова
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.7)
Младший научный сотрудник	_____	Р.З.Сулейманов
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.10)
Младший научный сотрудник	_____	С.Ю.Филькин
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.1, 1.2.2., 1.2.13)
Младший научный сотрудник к.х.н	_____	И.А.Шашков
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.6, 1.2.7)
Инженер	_____	К.Г.Зайцев
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.7)
Инженер	_____	Т.А.Помазкова
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.7)
Инженер	_____	А.М.Цедилин
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.1, 1.2.11)
Старший лаборант	_____	М.В.Куликова
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.3)
Старший лаборант	_____	Т.А.Чертилина
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.4)
Лаборант	_____	М.К.Алиева
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.18, 1.2.19)
Лаборант	_____	А.Г.Тарабарова
	« ____ » _____ 2021 г	(раздел 1.2.2)
Нормоконтролер	_____	М.А.Сапелкин
	« ____ » _____ 2021 г	

Соисполнители:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова»

Руководитель проекта, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики, д.б.н.	_____ 2021 г « _____ » _____	М.Г.Страховская (раздел 1.3.1, раздел 1.3.2, заключение)
Профессор кафедры генетики, д.б.н., проф.	_____ 2021 г « _____ » _____	А.И. Ким (раздел 1.3.1, раздел 1.3.2)
Доцент кафедры микробиологии, к.б.н.	_____ 2021 г « _____ » _____	А.А. Осмоловский (раздел 1.3.1, раздел 1.3.2)
Доцент кафедры биоинженерии, д.ф.-м.н.	_____ 2021 г « _____ » _____	А.К. Шайтан (раздел 1.3.1)
Ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии, к.ф.-м.н.	_____ 2021 г « _____ » _____	Г.А. Армеев (раздел 1.3.1)
Научный сотрудник кафедры биофизики, к.ф.-м.н.	_____ 2021 г « _____ » _____	В.А. Федоров (раздел 1.3.1)
Научный сотрудник кафедры биофизики, к.б.н.	_____ 2021 г « _____ » _____	Н.С. Беленикина (раздел 1.3.2)
Младший научный сотрудник кафедры биоинженерии	_____ 2021 г « _____ » _____	М.Г. Карлова (раздел 1.3.1)
Младший научный сотрудник кафедры биофизики	_____ 2021 г « _____ » _____	Е.Г. Холина (раздел 1.3.2)
Ведущий инженер кафедры синтетической биологии	_____ 2021 г « _____ » _____	В.Н. Марченко (раздел 1.3.2)
Инженер кафедры молекулярной биологии	_____ 2021 г « _____ » _____	А.В. Федяков (раздел 1.3.1)

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации Федеральное  
Государственное Бюджетное Образовательное Учреждение высшего образования  
«Воронежский Государственный Университет Инженерных Технологий»

Руководитель  
исследовательской \_\_\_\_\_  
программы: \_\_\_\_\_ Попов В.Н. (раздел 1.3.2,  
ректор, д.б.н. « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г заключение)  
Старший научный  
сотрудник \_\_\_\_\_  
кафедры биохимии и \_\_\_\_\_ Мещерякова О.Л. (раздел  
биотехнологий, к.т.н. « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г 1.3.2)  
Проректор по научной и \_\_\_\_\_ Корнеева О.С. (раздел 1.3.2)  
инновационной  
деятельности, \_\_\_\_\_  
зав. кафедрой биохимии и \_\_\_\_\_  
биотехнологий, д.б.н. « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г  
Доцент кафедры \_\_\_\_\_  
биохимии и \_\_\_\_\_ Ожерельева О.Н. (раздел 1.3.2)  
биотехнологий, к.т.н. \_\_\_\_\_  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г  
Заместитель начальника  
учебно-методического \_\_\_\_\_  
управления доцент \_\_\_\_\_ Данылиев М.М. (раздел 1.3.2)  
кафедры технологии \_\_\_\_\_  
продуктов животного \_\_\_\_\_  
происхождения, к.т.н. « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г  
Доцент кафедры \_\_\_\_\_  
биохимии и \_\_\_\_\_ Мальцева О.Ю. (раздел 1.3.2)  
биотехнологий, к.т.н. \_\_\_\_\_  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г  
Младший научный \_\_\_\_\_  
сотрудник лаборатории \_\_\_\_\_  
метагеномики и пищевых \_\_\_\_\_  
биотехнологий « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г Грязнова М.В. (раздел 1.3.2)  
Профессор кафедры \_\_\_\_\_  
технологии жиров, \_\_\_\_\_  
процессов и аппаратов \_\_\_\_\_  
химических и пищевых \_\_\_\_\_  
производств, д.т.н. « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г Фролова Л.Н. (раздел 1.3.2)  
Младший научный \_\_\_\_\_

сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий	_____	« _____ » _____ 2021 г	Толкачёва А.А. (раздел 1.3.2)
Младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий	_____	« _____ » _____ 2021 г	Виткалова И.Ю. (раздел 1.3.2)
Младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий	_____	« _____ » _____ 2021 г	Гладких М.И. (раздел 1.3.2)
Младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий	_____	« _____ » _____ 2021 г	Дворецкая Ю.Д. (раздел 1.3.2)
Младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, к.б.н.	_____	« _____ » _____ 2021 г	Кокина А.В. (раздел 1.3.2)
Ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, к.б.н.	_____	« _____ » _____ 2021 г	Сыромятников М.Ю. (раздел 1.3.2)
Доцент кафедры биохимии и биотехнологий, к.б.н.	_____	« _____ » _____ 2021 г	Свиридова Т.С. (раздел 1.3.2)
Младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий	_____	« _____ » _____ 2021 г	Некрасова Н.А. (раздел 1.3.2)
Младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий	_____	« _____ » _____ 2021 г	Нестерова Е.Ю. (раздел 1.3.2)

Общество с ограниченной ответственностью «Агрофермент»

Главный инженер Мосеев П.А. (раздел 1.2.16)

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г  
Главный технолог Харламова А.В. (раздел 1.2.16)

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г  
Старший микробиолог Мысютина Е.А. (раздел 1.2.17)

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г

## СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ .....	15
ВВЕДЕНИЕ.....	16
1 РАЗВИТИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ЗАДАЧ ПРОМЫШЛЕННЫХ И ПИЩЕВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ.....	21
1.1 Мероприятия по созданию и развитию на базе научных и образовательных организаций высшего образования лабораторий и центров, осуществляющих исследования в области генетических технологий, в частности технологий генетического редактирования, и их техническую поддержку, по направлениям реализации Федеральной программы.....	21
1.1.1 Создание Центра микробной ферментации, в котором будут сконцентрировано оборудование для культивирования бактерий и дрожжей/грибов, соответствующий персонал и оборудование .....	21
1.1.2 Составление спецификаций комплекса оборудования для культивации и сбора рекомбинантных микроорганизмов .....	21
1.1.3 Подготовка помещений для размещения комплекса оборудования для культивации и сбора рекомбинантных микроорганизмов.....	22
1.2 Мероприятия по проведению научных исследований и разработок с применением генетических технологий, включая разработку биологических препаратов, диагностических систем и иммунобиологических средств для сферы здравоохранения, а также биотехнологий для сельского хозяйства и промышленности .....	23
1.2.1 Разработка стратегии направленного введения в геном метилотрофных дрожжей экспрессионных кассет рекомбинантных белков, которая позволит в дальнейшем проводить редактирование генома с целью проверки действия различных мутаций на продуктивность штамма, в т.ч. выбор промоторов, локусов интеграции, векторов для модификации, источников генов, кодирующих реннин .....	25
1.2.2 Создание вектора для экспрессии CRISPR/Cas9 системы в <i>Pichia pastoris</i> .....	40
1.2.3 Создание генетической конструкции для инактивации гена пути биосинтеза мочевины в штамме винных дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> I-328 .....	49
1.2.4 Создание генетической конструкции для экспрессии генов малат-пермеазы и малолактического фермента в дрожжах .....	56

1.2.5 Создание генетических конструкций, обеспечивающих направленную интеграцию «кассет экспрессии» целевых генов в наиболее предпочтительные локусы хромосом <i>P. pastoris</i> , обеспечивающих получение рекомбинантных продуцентов, свободных от генов антибиотикорезистентности, мобильных элементов и бактериальных плазмидных репликонов.....	68
1.2.6 Получение рекомбинантных штаммов <i>Penicillium verruculosum</i> – продуцентов «бинарных» комплексов эндоглюканазы/фитазы и ксиланазы/фитазы .....	71
1.2.6.1 Разработка генетических конструкций для трансформации компетентных клеток.....	74
1.2.6.2 Трансформация штамма-реципиента <i>Penicillium verruculosum</i> 537 .....	76
1.2.6.3 Получение ферментных комплексов, содержащих гетерологичную фитазу А 63 кДа <i>Aspergillus niger</i> и гомологичную эндо-1,4-β-глюканазу II 39 кДа <i>Penicillium verruculosum</i> .....	78
1.2.6.4 Получение ферментных комплексов, содержащих гетерологичные фитазу 63 кДа <i>Aspergillus niger</i> и ксиланазу Е 40 кДа <i>Penicillium canescens</i> .....	84
1.2.7 Получение сухих форм ферментных препаратов серии PhyXy1 и PhyEg: .....	89
- проведение ферментации рекомбинантных штаммов из п. 1.2.6. на стандартных ферментационных средах для <i>P. verruculosum</i> на лабораторном ферментационном комплексе;.....	89
- отделение, микрофльтрация и высушивание культуральной жидкости;.....	89
- определение ферментативных активностей по – глюкану (ГОСТ 34176-2017), ксилану (ГОСТ Р55302-2012) и фитату натрия (ГОСТ 31487-2012) .....	89
1.2.7.1 Проведение ферментации рекомбинантных штаммов из п.п 1.2.6.3 -1.2.6.4 на стандартных ферментационных средах для <i>P. verruculosum</i> на лабораторном ферментационном комплексе .....	89
1.2.7.2 Отделение, микрофльтрация и высушивание культуральной жидкости .....	93
1.2.7.3 Определение ферментативных активностей по -глюкану (ГОСТ 34176-2017), ксилану (ГОСТ Р 55302-2012) и фитату натрия (ГОСТ 31487-2012) .....	95
1.2.8 Разработка генетических конструкций для нокаута маркерного гена <i>niaD</i> , кодирующего нитратредуктазу в рекомбинантных штаммах <i>P. verruculosum</i> PhyXy1 и PhyEg методом CRISPR/Cas9.....	98



1.2.9 Формирование пула изолятов метанотрофных бактерий рода <i>Methylococcus</i> , способных к росту в широком диапазоне концентраций метанола. Отбор наиболее перспективного штамма-объекта для геномных модификаций, демонстрирующего высокую удельную скорость роста на метаноле и максимальную эффективность формирования колоний на агаризованных средах.....	102
1.2.10 Проверка устойчивости целевого штамма метанотрофных бактерий к антибиотикам.	106
1.2.11 Анализ особенностей метаболизма целевого штамма метанотрофа на основе данных его полной геномной последовательности .....	108
1.2.12 Проверка доступных векторов для подбора маркеров антибиотикоустойчивости для работы с целевым штаммом метанотрофа.....	113
1.2.13 Проведение аналитического обзора литературы для выявления описанных в литературе особенностей использования CRISPR/Cas9 систем в различных видах дрожжей	117
1.2.13.1 Происхождение и устройство системы CRISPR/Cas .....	118
1.2.13.2 Мультиплексная модификация генома дрожжей .....	119
1.2.13.3 Регуляция экспрессии генов на основе CRISPR/Cas9 .....	121
1.2.13.4 Введение точечных мутаций .....	121
1.2.13.5 Использование CRISPR/Cas для геномной инженерии дрожжей .....	122
1.2.14 Создание и фенотипический анализ штамма с делецией гена MET8 с целью характеристики этой модификации в качестве ауксотрофного маркера в <i>Ogataea polymorpha</i> .....	123
1.2.15 Разработка стратегии создания генетических конструкций с увеличенной продукцией транскрипционных факторов, включая Hac1 и Fhl1p. Создание генетической конструкции с увеличенной продукцией по крайней мере одного из транскрипционных факторов в <i>P. pastoris</i> . Подбор альтернативных промоторов для масштабируемого получения целевых белков в <i>P. pastoris</i> .....	126
1.2.16 Проведение экспериментальной ферментации штамма <i>P. verruculosum</i> в ферментере V= 50 л с наработкой партии ферментных препаратов фитазы для отработки технологической схемы культивирования гриба .....	139
1.2.16.1 Протокол ферментации №1 в V=50 л .....	139
1.2.16.2 Протокол ферментации №2 в V=50 л .....	151
1.2.17 Проведение опытной ферментации штамма <i>P. verruculosum</i> в ферментере V= 10 м3 с наработкой партии ферментных препаратов моно-фитазы .....	163

1.2.17.1 Технологическая карта ферментации в товарном ферментере Ф-2/1 с исходным объемом 7400 л .....	163
1.2.17.2 Технологическая карта ферментации в инокуляторах 1 м <sup>3</sup> Ф-1/1 (посевные ферментеры) .....	168
1.2.18 Создание генетической конструкции для продукции реннина в <i>O. Polymorpha</i> .....	171
1.2.19 Создание генетической конструкции для продукции человеческого альбумина в <i>O. Polymorpha</i> .....	172
1.3 Мероприятия по подготовке высококвалифицированных кадров по направления реализации Федеральной программы .....	174
1.3.1 Организация научной стажировки для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет .....	174
1.3.2 Организация регулярного научно-практического семинара для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет по тематике исследовательской программы .....	176
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	182
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	183
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	193
ПРИЛОЖЕНИЕ Б .....	204
ПРИЛОЖЕНИЕ В .....	339

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

CRISPR/Cas9 – система геномного редактирования, основанная применении РНК-зависимой эндонуклеазы Cas9

Glc – остатки глюкозы

LHAase - гиалуронидаза пиявки

Man – остатки маннозы

NAc – остатки N-ацетил глюкозамина

SILAC - стабильное мечение белков путем добавления аминокислот, содержащих нерадиоактивные изотопные атомы

U -units – единицы активности

UPR – unfolded protein response, реакция клетки на наличие поврежденных белков в эндоплазматическом ретикулуме

UTR – untranslated region - нетранслируемая область мРНК

YPD – Yeast Peptone Dextrose, богатая среда для культивирования дрожжей и других грибов

КЖ – культуральная жидкость

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

МДГ - пирролохинолинхинон-зависимая метанолдегидрогеназой

МКЦ - микрокристаллическая целлюлоза

НПС - некрахмальные полисахариды

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РМФ - рибулозомонофосфат

СП - Сигнальные пептиды секреции

ФП – ферментный препарат

ЭР – эндоплазматический ретикулум

## ВВЕДЕНИЕ

**Ключевые слова:** дрожжи, мицелиальные грибы, метанотрофы, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Ogataea*, *Pichia*, *Penicillium*, *Methanococcus*, реннин, альбумин, виноделие, CRISPR/Cas9, кормовые добавки, кормовой белок

Важность создания новых промышленных, пищевых и агро- биотехнологий определяется Стратегией Научно-технологического развития страны, а также Доктриной продовольственной безопасности страны. Главные приоритеты Доктрины продовольственной безопасности страны - это обеспечение граждан качественной и безопасной пищевой продукцией, устойчивое развитие и модернизацию сельского хозяйства и инфраструктуры внутреннего рынка, развитие производства сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия. В связи с высоким риском отставания от развитых стран в уровне технологического и научного развития производственной базы, развитие в стране научных исследований и технологий в данных областях является важнейшим приоритетом.

Глобальные вызовы в промышленности и сельском хозяйстве связаны с необходимостью производства биоматериалов и биополимеров, увеличения производства продуктов питания и принципиального изменения его структуры и качества. Это обусловлено совокупностью экономических, социальных, экологических причин. В особенности важно обеспечение роста производства кормового белка. Решение этих вызовов невозможно без использования и дальнейшего развития промышленных биотехнологий.

Биотехнологический сектор является высоко-конкурентным, и поддержание рентабельного производства требует обеспечения максимально высокого выхода продукта (например, фермента, или микроорганизма в целом с заданным набором характеристик), а также минимизации стоимости производства, что означает необходимость биоинженерии оптимизированных штаммов – продуцентов. В связи с этим, требуется создание быстрых и эффективных методов генной инженерии и их эффективное применение. В частности, это может быть достигнуто за счет изменения активности отдельных метаболических путей или клеточных систем, увеличивающих выходы целевых продуктов. Для решения указанных проблем в настоящее время бурно развиваются методы и подходы геномного редактирования для метаболической инженерии и синтетической (инженерной) биологии, которые, с высокой вероятностью, будут одними из основных драйверов роста мировой биотехнологической отрасли в ближайшие десять лет.

В связи с этим, центральной задачей проекта была разработка и применение

соответствующих методов и подходов геномного редактирования для создания штаммов-продуцентов коммерчески-востребованных продуктов (рекомбинантных ферментов, пищевых и кормовых продуктов). В связи с тем, что различные задачи требуют применения разных субстратов, а также с тем, что разные продукты могут быть получены оптимальным путем в разных продуцентах, создание и оптимизация различных микробных платформ – это крайне важная задача.

Важнейшие микробные платформы для производства пищевых и кормовых продуктов, а также ферментов – это одноклеточные (дрожжи) и мицелиальные грибы, а также бактерии.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* традиционно используются в производстве широкого круга пищевых продуктов, в том числе и в виноделии. Дрожжи этого вида, а также ряд метилотрофных дрожжей (*Pichia pastoris*, *Ogatea polymorpha*) также активно используются для получения различных ферментов и других белков, применяемых в различных областях промышленности.

Мицелиальные грибы обладают широким спектром гидролитических ферментов, которые они продуцируют с крайне высокой эффективностью, в связи с чем они интенсивно используются в качестве продуцентов эндогенных и рекомбинантных промышленно-значимых белков.

Аэробные метанотрофные бактерии – это прокариотические микроорганизмы, обладающие уникальными ферментами, метанмонооксигеназами, позволяющими им использовать метан (CH<sub>4</sub>) в качестве ростового субстрата. Эта метаболическая особенность метанотрофов лежит в основе их применения в качестве продуцентов микробного белка при росте на природном газе.

Таким образом, научная составляющая проекта была сфокусирована на следующих основных научных направлениях:

а) Разработка и применение технологий геномного редактирования для направленного изменения генома и метаболической инженерии (в т.ч. гликоинженерии) с целью создания высоко-продуктивных дрожжевых штаммов, применяемых при производстве индустриально-значимых белков и в виноделии.

В рамках данного этапа проекта был проведен анализ готовых, а также сформированы стратегии создания новых инструментов для редактирования геномов нескольких видов дрожжей, в том числе основанных на системе CRISPR/Cas9. На основании полученных сведений, были инициированы работы по созданию новых штаммов с улучшенными

характеристиками как: а) для продукции индустриально значимых секретируемых белков (реннина и человеческого альбумина), а также для дальнейшего использования в качестве технологической платформы для получения широкого круга других рекомбинантных белков, б) для виноделия, для создания вин со сниженной продукцией канцерогенных веществ и новыми, улучшенными вкусовыми качествами.

Были разработаны стратегии направленного введения в геном метилотрофных дрожжей *P.pastoris* экспрессионных кассет рекомбинантных белков с использованием различных подходов, в том числе и методов геномного редактирования CRISPR/Cas9. Оптимизированы стратегии геномного редактирования методами CRISPR/Cas9 для создания ауксотрофных штаммов *P. pastoris*. Были разработаны экспрессионные кассеты для увеличенной продукции транскрипционных факторов sHAC1 и Fh11p, для масштабированного получения целевых белков в *P.pastoris*.

Были созданы генетические конструкции для продукции альбумина и реннина в клетках метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha*. Кроме того, в этом виде дрожжей была произведена характеристика делеции гена MET8 в качестве перспективного ауксотрофного маркера. Было показано что делецию этого гена легко получить, пользуясь тем, что такое нарушение вызывает накопление флуоресцентного порфирина в клетках. Результаты этой работы были опубликованы в статье в журнале из первого квартиля по Web of Science.

Также на данном этапе работ на основе одной из платформ для CRISPR/Cas9 геномной инженерии нами были созданы генетические конструкции для модификации генома штамма винных дрожжей I-328 (с целью нарушения пути биосинтеза мочевины и внедрения возможности осуществления яблочно-молочного брожения). Для расширения представлений о том, какие факторы, возникающие при виноделии могут приводить к гибели дрожжей, был проведен обзор литературы в области влияния различных кислот, спиртов и микроорганизмов на клеточную смерть. Результаты этой работы были включены в состав масштабного систематического обзора, опубликованного в журнале, входящий в первый квартиль по Web of Science.

б) Разработка и применение генетических технологий для создания грибных продуцентов одновременно нескольких ферментов (ксиланаза/фитаза, эндоглюканаза/фитаза и ксиланаза/эндоглюканаза/фитаза) как кормовых добавок для сельскохозяйственных животных

В рамках первого этапа проекта на основе экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* были получены рекомбинантные штаммы серии *P.verruculosum* PhyEg и серии

*P. verruculosum* PhyXyl, секретирующие попарно ферменты, востребованные кормовой отраслью. Был проведен скрининг новых штаммов по критерию наибольшей фитазной/эндоглюканазной или фитазной/ксиланазной активности при сохранении уровня общего секретируемого белка. Были отобраны штаммы *P. verruculosum* PhyEg-36 (активность по фитату натрия составила 1830 ед/мл, по б-глюкану - 1040 ед/мл), *P. verruculosum* PhyEg-76 (активность по фитату натрия составила 1750 ед/мл, по б-глюкану - 980 ед/мл), *P. verruculosum* PhyXyl-2 (активность по фитату натрия составила 1750 ед/мл, по ксилану бука - 980 ед/мл), *P. verruculosum* PhyXyl-47 (активность по фитату натрия составила 1660 ед/мл, по ксилану бука - 950 ед/мл). На основе отобранных продуцентов в ЦКП “Биотехнология” были получены сухие формы ферментных препаратов.

Была разработана плазида pGCS для нокаута гена *niaD A. niger* в штаммах-продуцентах бинарные комплексы кормовых ферментов с целью получения ауксотрофного признака для возможности внесения третьей необходимой активности в комплексный кормовой ферментный препарат. В плазмиде pGCS транскрипция гена *cas9* контролируется конститутивным промотором *gpdA* и терминатором *cbh1 P. verruculosum*. На 5'- и 3'-концах гена *cas9* расположены последовательности, кодирующие сайты внутриядерной локализации. Для транскрипции последовательности кодирующей sgRNA используется промотор 5S рНК гриба *A. niger*.

Также, была разработана плазида pGCSA, содержащая фрагмент AMA1 *Aspergillus nidulans*, что позволяет избежать интеграции в хромосомную ДНК гриба. Плазида pGCSA содержит ген *cas9* под контролем конститутивного промотора *gpdA P. verruculosum* и последовательность, кодирующую sgRNA со спейсером специфичным для гена *niaD A. niger* и последовательность AMA1.

в) Генетическая модификация метанотрофных бактерий с целью создания оптимизированных штаммов, использующих природный газ в качестве источника углерода, которые могут применяться для наработки ценной биомассы, а также для продукции индустриально-значимых соединений

Исследования, проведенные в рамках этапа позволили отобрать в качестве наиболее перспективных культур для дальнейших работ по редактированию геномов метанотрофных бактерий новые изоляты *Methylococcus capsulatus*, штаммы MIR и KN2, способные расти как на метане, так и на метаноле, в широком диапазоне концентраций последнего. В качестве основного штамма выбран штамм MIR; штамму KN2 присвоен статус резервного. Получена

полная последовательность генома штамма MIR высокого качества сборки, что позволило провести детальный анализ путей ассимиляции углерода и азота и идентифицировать гены центрального и промежуточного метаболизма.

Экспериментальная проверка позволила показать отсутствие у *Methylococcus capsulatus* MIR природной или спонтанно возникающей устойчивости к канамицину, гентамицину и спектиномицину, что потенциально позволяет использовать гены устойчивости к данным антибиотикам при генетическом редактировании этого метанотрофа. Канамицин, гентамицин и спектиномицин в качестве селективных факторов отбора должны быть применены в концентрациях 50, 10 и 100 мкг/мл, соответственно.

Показана принципиальная возможность использования IncP-основанных челночных плазмид pAWP78, pSB2 и pSB3 в качестве векторов для штамма *Methylococcus capsulatus* MIR. Эти плазмиды, поддерживаемые клетками метанотрофа, могут быть использованы для экспрессии гомо- или гетерологичных генов, а кодируемые ими гены устойчивости к канамицину, гентамицину и спектиномицину могут быть применены для генетической модификации целевого штамма метанотрофа.

Для осуществления научной программы также проведен ряд мероприятий по созданию инфраструктуры для генетических исследований в ФИЦ Биотехнологии РАН. Это включает в себя создание нового подразделения Центра микробной ферментации, подготовка его помещений для установки нового оборудования, а также планирование спецификаций оборудования, которое будет приобретено в 2022 году.

Наконец, для подготовки квалифицированных кадров для проведения исследований в области генетических технологий, проведена серия семинаров, посвященных генетическим технологиям в образовательных организациях, которые являются соисполнителями проекта, а также проведена стажировка молодых ученых на базе МГУ им. М.В. Ломоносова.



# **1 РАЗВИТИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ЗАДАЧ ПРОМЫШЛЕННЫХ И ПИЩЕВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ**

**1.1 Мероприятия по созданию и развитию на базе научных и образовательных организаций высшего образования лабораторий и центров, осуществляющих исследования в области генетических технологий, в частности технологий генетического редактирования, и их техническую поддержку, по направлениям реализации Федеральной программы**

1.1.1 Создание Центра микробной ферментации, в котором будут сконцентрировано оборудование для культивирования бактерий и дрожжей/грибов, соответствующий персонал и оборудование

Для увеличения эффективности работы по разработке технологий наработки штаммов, полученных в рамках исследовательской программы, было создано научно-вспомогательное подразделение Центр микробной ферментации. Это подразделение имеет квалифицированный персонал для выполнения работ по получению больших объемов биомассы различных микроорганизмов и подготовке культуральной жидкости или клеток для дальнейших манипуляций по получению конечных продуктов. Центр также располагает обширным парком оборудования для проведения полного цикла работ по пилотированию процедур массового культивирования микробов в различных масштабах. Приказ директора о создании центра - Приложение А.

1.1.2 Составление спецификаций комплекса оборудования для культивации и сбора рекомбинантных микроорганизмов

Для выполнения задач, поставленных в исследовательской программе, для Центра микробной ферментации было запланировано приобретение комплекса приборов для культивации и сбора рекомбинантных микроорганизмов. Для того, чтобы приобрести это оборудование в 2022 году, был составлен список необходимых приборов, и были сформулированы спецификации этого оборудования, которые представлены в Приложении А

### 1.1.3 Подготовка помещений для размещения комплекса оборудования для культивации и сбора рекомбинантных микроорганизмов

Проведен комплекс работ в результате которых пространство подготовлено для размещения нового оборудования. В состав работ входило:

- Очистка стен и потолка от краски, демонтаж элементов освещения, снятие напольного покрытия.
- Грунтовка и покраска потолка.
- Монтаж новой осветительной системы.
- Обшивка стен водостойким гипсокартоном.
- Шпаклёвка и покраска обшитых гипсокартоном стен.
- Замена электропроводки и розеток.
- Укладка напольного покрытия (плитка).
- Создание системы, обеспечивающей сток воды в канализацию в случае прорыва водной магистрали.
- Демонтаж элементов старой канализационной системы и протяжка новой системы.
- Монтаж водной магистрали для обеспечения элементов оборудования водяным охлаждением.
- Установка системы фильтров на водную магистраль.
- Монтаж воздушной линии для обеспечения элементов оборудования сжатым воздухом.
- Монтаж системы для условной стерилизации помещения.

Акт о приемке работ находится в приложении А

## 1.2 Мероприятия по проведению научных исследований и разработок с применением генетических технологий, включая разработку биологических препаратов, диагностических систем и иммунобиологических средств для сферы здравоохранения, а также биотехнологий для сельского хозяйства и промышленности

Дрожжи на протяжении тысячелетий используются человеком для получения вина, хлеба, пива и других ферментированных пищевых продуктов. При этом их значение в этом секторе экономики продолжает расти.

Дрожжи активно используются для продукции рекомбинантных белков. Несмотря на то, что множество таких белков производятся в *S. cerevisiae*, этот вид не является наиболее эффективной платформой. Наибольшее признание в этом качестве получили несколько других видов дрожжей, называемых метилотрофными дрожжами из-за способности утилизировать метанол в качестве источника энергии и углерода. В частности, это виды дрожжей, которые традиционно называются *Pichia pastoris* (в настоящее время независимые изоляты выделены в отдельные виды *Komagataella phaffii*, *K. pastoris*, и *K. pseudopastoris*) и *Hansenula polymorpha* (сейчас это виды *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*). Преимуществами этих видов дрожжей по сравнению с *S. cerevisiae* являются простота получения культур высокой плотности, наличие сильных индуцибельных промоторов, активация которых происходит при росте на дешевых субстратах, таких как метанол, и менее интенсивное гликозилирование секретируемых белков. Кроме того, дрожжи *O. polymorpha* и *O. parapolyomorpha* являются термотолерантными, что позволяет проводить ферментацию при более высоких температурах, снижая затраты на охлаждение.

Классические методы улучшения штаммов, основанные на многократном чередовании последовательных этапов мутагенеза и селекции, длительны и трудоемки, и на смену им в последнее время приходят методы направленной селекции, основанные на достижениях геномики, системной биологии и генетической инженерии дрожжей.

Предпосылкой эффективного применения данных технологий является как совершенствование методов генетического манипулирования с промышленными штаммами дрожжей, так и углубленное представление о генетических механизмах, определяющих специфические производственные характеристики тех или иных штаммов, их адаптацию к определенным условиям производства. Разработанный для лабораторных штаммов *S. cerevisiae* инструментарий генетической инженерии и направленной модификации генома широко

используются для исследований в области функциональной геномики, синтетической биологии, биотехнологии, метаболической инженерии. В то же время, применение таких подходов для промышленных штаммов *S cerevisiae*, а также других видов дрожжей сталкивается с определенными трудностями. Многие штаммы промышленных дрожжей являются полиплоидами, плохо спорулируют, для них нет, или ограничено число удобных ауксотрофных маркеров и т.д. Применение CRISPR/Cas9 систем геномного редактирования позволяет успешно преодолевать эти ограничения. В последние годы с помощью геномного редактирования получены промышленные штаммы дрожжей с улучшенными характеристиками для переработки лигноцеллюлозного сырья, продукции витаминов и добавок, улучшающих питательные и вкусовые свойства получаемых пищевых продуктов. Для безопасности пищевой продукции важно, что применение методов CRISPR/Cas9 геномного редактирования не несет рисков, связанных с внедрением в геном применяемых штаммов дрожжей чужеродных генов и генетических элементов, маркеров устойчивости к антибиотикам, т.е. полученные штаммы являются биологически безопасными согласно принятым в ряде стран, включая США, регуляторным ограничениям.

В частности, исследование и создание новых винодельческих штаммов дрожжей - это активно развивающаяся область исследований и технологии. Современное промышленное виноделие основано на использовании стартовых культур специализированных винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Коммерческие винные штаммы обладают целым рядом преимуществ перед природными изолятами и именно их использование гарантирует устойчивость и воспроизводимость технологий промышленного виноделия. В то же время, растущая конкуренция на мировом рынке выдвигает новые требования к качеству вин и стимулируют виноделов и биотехнологов к разработке новых штаммов и технологий.

Таким образом, настоящий раздел проекта направлен на получение новых штаммов-продуцентов коммерчески-востребованных рекомбинантных белков с улучшенными характеристиками, а также на получение улучшенных штаммов винных дрожжей отечественной селекции.

1.2.1 Разработка стратегии направленного введения в геном метилотрофных дрожжей экспрессионных кассет рекомбинантных белков, которая позволит в дальнейшем проводить редактирование генома с целью проверки действия различных мутаций на продуктивность штамма, в т.ч. выбор промоторов, локусов интеграции, векторов для модификации, источников генов, кодирующих реннин

Аннотация полногеномных последовательностей *P. Pastoris* является важным шагом в сторону рациональной геномной инженерии и системной биологии *P. pastoris*[45]. Две онлайн-базы данных ([http:// bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/overview/Picpa](http://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/overview/Picpa) и <http://www.pichiagenome.org>) обеспечивают удобный доступ к аннотированным последовательностям генома. На данный момент наиболее часто используемыми коммерчески доступными штаммами являются штамм *his4<sup>-</sup>* GS115, восстановленный прототрофный штамм X-33, нокаут *aox1* штамм KM71 и KM71H, а также протеазодефицитные штаммы SMD1168 и SMD1168H и ауксотрофный *ade2* штамм PichiaPink™. Однако использование этих штаммов в коммерческих целях ограничено патентной защитой и политикой владения материалами. Штаммы, полученные из *P. pastoris* CBS7435, напротив, не защищены патентами и, следовательно, представляют собой хорошую альтернативу для производственных целей. Кроме того, штамм CBS7435 MutS, разработанный Graz Pichia Pool не содержит маркеров, поскольку он был сконструирован с использованием методов, основанных на применении рекомбиназы Flp/FRT. Используя ту же стратегию, нокаут-штаммы *ade1* и *his4* были созданы вместе со штаммом CBS7435 *ku70* (CBS 12694), у которого нарушен механизм негомологичной рекомбинации, и тем самым, повышена вероятность гомологичной рекомбинации. Составлена подборка наиболее актуальных штаммов в таблицах 1 и 2.

#### **Ауксотрофные штаммы**

Несколько ауксотрофных штаммов (например, *ade1*, *arg4*, *his4*, *ura3*, *met2*), и их комбинации доступны вместе с векторами, несущими соответствующие гены в качестве селективных маркеров. Так, например, штамм-продуцент липазы В *Candida antarctica* (CALB) *P. pastoris* X-33 *aro1*, дефицитный по биосинтезу триптофана, тирозина и фенилаланина, использовался для создания фторированной липазы. Фторированные аналоги дефицитных аминокислот были добавлены и включены в гетерологичный белок, таким образом, например, продлевая время жизни CALB, но снижая его липазную активность [14]. Однако протеолитический паттерн CALB сохранился. Другим примером является использование

штамма с двойным нокаутом *lys2 arg4* для стабильного мечения изотопов аминокислотами в культуре клеток (SILAC) [88]. Основные типы штаммов данной группы приведены в таблице 1

### ***Штаммы со сниженным содержанием протеаз***

Нежелательный протеолиз гетерологичных белков, экспрессируемых в *P. pastoris*, снижает не только выход продукта или биологическую активность, но также усложняет последующую обработку продукта, поскольку продукты разложения будут иметь аналогичные физико-химические и аффинные свойства. Протеолиз может происходить либо во время везикулярного транспорта рекомбинантного белка посредством резидентной протеазы секреторного пути или во внеклеточном пространстве протеазами секретируются, связаны с клеточной стенкой или высвобождается в культуральную среду в результате разрушения клеток во время культивирования с высокой плотностью клеток. Для решения проблемы протеолиза гетерологичных белков возможно использовать разные стратегии, а именно: изменение параметров ферментации (рН, температура и удельная скорость роста), изменение состава среды (богатая среда, добавление казаминовых аминокислот или пептона в качестве конкурирующих субстратов), снижение концентрации соли и добавление отдельных аминокислотных компонентов, применение стратегии белковой инженерии и инженерия хозяина экспрессии для получения протеазодефицитного штамма.

Таблица 1- Различные типы свободно-доступных штаммов *Pichia pastoris*

1. Штаммы, дефицитные по протеазе			
Штамм	Генотип	Фенотип	Источник
SMD1163	his4 pep4 prb1	His <sup>-</sup>	(Gleeson et al. 1998)
SMD1165	his4 prb1	His <sup>-</sup>	(Gleeson et al. 1998)
SMD1168	his4 pep4::URA3 ura3	His <sup>-</sup>	Life Technologies™
SMD1168H	pep4		Life Technologies™
SMD1168	kex1::SUC2 pep4::URA3 kex1::SUC2 his4 ura3	His <sup>-</sup>	(Boehm et al. 1999)
PichiaPink 2-4	prb1/pep4	Ade <sup>-</sup>	Life Technologies™
BG21	sub2		BioGrammatics
CBS7435	prc1a prc1		(Pp6676)
CBS7435	sub2a sub2		(Pp6668)b
CBS7435	sub2a his4 pep4	His <sup>-</sup>	(Pp6911)b
CBS7435	prb1a prb1		(Pp6912)b
CBS7435	his4 pep4 prb1 his4 pep4 prb1	His <sup>-</sup>	(Pp7013)b

Продолжение таблицы 1

2. Гликоинженерные штаммы				
SuperMan5	his4 och1::pGAPTrα1,2-mannosidase	His-	BlasticidinR	BioGrammatics
	och1::pGAPTrα1,2-mannosidase		BlasticidinR	BioGrammatics
	per4 och1::pGAPTrα1,2-mannosidase		BlasticidinR	BioGrammatics
3. Прочие штаммы				
GS241	fld1	Growth defect on methanol as sole C-source or methylamine as sole N-source		(Shen et al. 1998)
MS105	his4 fld1	See GS241;	His-	(Shen et al. 1998)
MC100-3	his4 arg4 aox1::ScARG4 aox2::PpHIS4		Mut-	(Cregg et al. 1989)
CBS7435 ku70	a ku70		WT	(Näätsaari et al. 2012)
CBS7435 ku70 his4	ku70, his4		His-	(Näätsaari et al. 2012)
CBS7435 ku70 gut1	ku70, gut1	дефект роста на глицерине;	ZeocinR	(Näätsaari et al. 2012)
CBS7435 ku70 ade1	ku70, ade1		Ade- ZeocinR	(Näätsaari et al. 2012)

Однако в некоторых случаях оптимизация ферментационных сред и стратегии белковой инженерии оказываются неэффективны для облегчения проблем протеолиза и секреции. Использование протеазодефицитных штаммов, таких как SMD1163 ( $\Delta$ his4  $\Delta$ per4  $\Delta$ prb1), SMD1165 ( $\Delta$ his4  $\Delta$ prb1) и SMD1168 ( $\Delta$ his4  $\Delta$ per4) хорошо зарекомендовало себя для экспрессии протеаз, чувствительных к протеолизу. PEP4 кодирует основную вакуолярную аспартилпротеазу, которая способна активироваться сама, а также активировать другие протеазы, такие как карбоксипептидазу Y (PRC1) и протеиназу B (PRB1). Использование других протеазодефицитных штаммов, кроме упомянутых выше (например, *yps1*, *kex1*, *kex2*), имеет переменный успех. Общий вывод из этих исследований состоит в том, что во многих случаях в деградацию вовлечены несколько протеаз, и поэтому затруднительно оптимизировать экспрессию белка, исключив только одну. Тем не менее, нокаутные штаммы *per4* и *prb1* по-прежнему являются наиболее эффективными в предотвращении деградации рекомбинантного белка, и поэтому широко применяются. При этом стоит отметить, что штаммы с дефицитом протеазы обычно демонстрируют более медленные темпы роста, снижение эффективности трансформации и снижение жизнеспособности. Недавно было создано 28 протеазодефицитных штаммов [77].

## *Гликоинженерные штаммы*

Когда дрожжи, такие как *P. pastoris*, используются для производства терапевтических белков, актуальным становится N- и O-связанное гликозилирование. Хотя сборка коровых гликанов, то есть  $(\text{Man})_8\text{-(GlcNAc)}_2$ , в эндоплазматическом ретикулуме является высококонсервативной у млекопитающих и дрожжей, млекопитающие демонстрируют более высокое разнообразие конечной структуры гликанов, собранных в везикулы Гольджи. Дрожжи, напротив, производят большое количество маннозо-гликановых структур, которые могут влиять на активность целевого белка, приводить к уменьшению периода полураспада в сыворотке крови, а также, что более важно, вызвать аллергические реакции в организме человека. Был проведен подробный обзор механизма гликозилирования и мишеней гликозилирования в различных видах дрожжей, в том числе *P. pastoris*. Рассмотренные инженерные стратегии включали введение  $\alpha$ -1,2-маннозидазы *Trichoderma reesei*, нокаут высококонсервативного дрожжевого белка Гольджи  $\alpha$ -1,6-маннозилтрансферазы, кодируемой геном OCH1, отвечающим за гипергликозилирование, а также ко-сверхэкспрессия нескольких гликозилтрансфераз и гликозидаз [80]. Терминально сialiрированные гликопротеины, впервые продуцируемые в *P. pastoris*, были получены путем введения сложного метаболического пути синтеза сиаловой кислоты. Решающей стала правильная локализация гетерологичных гликозилтрансферазы и гликозидазы в эндоплазматическом ретикулуме и комплексе Гольджи. Комбинаторные генетические библиотеки и высокопроизводительный скрининг были успешно применены, для поиска наилучших комбинаций при инженерии N-связанных гликанов. В совокупности данные стратегии позволяют производить ценные биофармацевтические препараты с более однородным, «гуманизированным» паттерном N-гликозилирования. Однако, поскольку дрожжи также осуществляют O-гликозилирование, структурно отличное от млекопитающих, O-гликозилирование также является интересной мишенью. У *P. pastoris* O-связанное гликозилирование инициируется моносахаридом маннозы, который дополнительно удлинен остатками  $\alpha$ -1,2-маннозы и, наконец, кэпируется остатками  $\beta$ -фосфоманнозы. До недавнего времени инженерные стратегии были ограничены использованием ингибитора основных ЭР-локализованных протеин-O-маннозилтрансфераз (PMT). Однако, делеция этих генов не приводила к надежным результатам, возможно из-за влияния на жизнеспособность штаммов. Исследование семейства генов PMT *P. pastoris* было важным шагом в инженерии O-гликозилирования. В этом исследовании отключение PMT, а также использование ингибиторов PMT привело к уменьшению количества событий O-маннозилирования и, кроме того, к



уменьшенной длине цепи О-гликанов. Последующее исследование описывает продукцию слитого белка. В нем  $\alpha$ -1,2-маннозидаза, а также  $\beta$ -1,2-N-ацетилглюкозаминил-трансфераза 1 (PomGnT1) коэкспрессировались в штамме *P. pastoris*. Следовательно, остатки маннозы сначала были обрезаны до единичных остатков маннозы, которые затем были кэпированы N-ацетилглюкозамином. Эта структура была дополнена остатками сиаловой кислоты для получения остатков О-гликана, аналогичного  $\alpha$ -дистрогликанам человека [81].

### ***Дизайн сигнальных пептидов***

Сигнальные пептиды секреции (СП) обычно локализируются на N-конце и состоят из трех частей, определяющих транслокацию растущего полипептида в эндоплазматический ретикулум (ЭР) и секрецию во внеклеточную среду. Хотя *P. pastoris* и считается одним из лучших микробиологических объектов для гетерологичной экспрессии гликозилированных белков, в последние десятилетия, было охарактеризовано мало известных последовательностей сигнальных пептидов для применения в секреторной экспрессии гетерологичных белков. В дополнение к широко используемому препропептиду и сигнальной последовательности альфа-фактора *S. cerevisiae*, иногда используется сигнальная последовательность кислой фосфатазы (PHO1) *S. cerevisiae*, а также сигнальная последовательность гена SUC2 и сигнальный пептид бычьего  $\beta$ -казеина. Кроме того, секреторная эффективность сигнальных пропептидов часто сильно различается, при слиянии с разными рекомбинантными белками. Таким образом, очень важно определить и охарактеризовать новых кандидатов и построить библиотеку сигнальных пептидов для индивидуального тестирования при секреции различных белков. С учетом этой точки зрения были описаны три новых сигнала секреции, содержащихся в гидрофобинах *Trichoderma reesei*. Было показано, что секреторные последовательности, полученные из белков HFBI и HFBIИ, имеют потенциал для поддержания высокого уровня секреция гетерологичных белков у *P. pastoris* [53]. Для высокого уровня экспрессии липазы В *Candida antarctica* (CALB), был изучен сигнальный пептид нативной липазы В (nsB), состоящий из 25 аминокислотных остатков. В результате было достигнуто примерно трехкратное увеличение производства CalB по сравнению с препропептидом альфа-фактора, что позволяет предполагать, что этот короткий сигнальный пептид nsB может быть хорошей альтернативой гетерологичной экспрессии белка у *P. pastoris*. Совсем недавно было улучшено производство гиалуронидазы пиявки (LHAase) в *P. pastoris* путем замены препропептида альфа-фактора последовательностью nsB, что еще раз демонстрирует большой потенциал этого короткого пептида для улучшения продукции

секретируемых ферментов [58]. Кроме того, во избежание фрагментации белков, содержащих сайты расщепления Kex2p, такие как KR и RR, была успешно идентифицирована новая сигнальная последовательность из 18 аминокислотных остатков из белка *P. pastoris*, обеспечивающая эффективную секрецию. Кроме того, с помощью экспрессии свиной карбоксипептидазы В и ингибитора трипсин эритрина подтверждена емкость и стойкость этого короткого сигнального пептида. В дополнение к вышеперечисленным последовательностям сигнальных пептидов, с помощью *in silico* и последующего экспериментального анализа было выделено и описано множество новых сигнальных пептидов. На сегодняшний день существует несколько программ прогнозирования сигнальных пептидов, в том числе SignalP4.1, Фобиус, WolfPsort0.2, ProP1.0 и NetNGlyc1.0. С помощью SignalP были предсказаны сигнальные пептиды из трех белков *P. pastoris* PpScw11p, PpDse4p и PpExg1p, и была исследована их способность регулировать секрецию рекомбинантных белков, в качестве репортеров использовались GFP и CALB. Результаты подтвердили, что у данных сигнальных пептидов был аналогичный или более высокий уровень секреции рекомбинантных белков по сравнению с препептидом альфа-фактора [34].

В последнее время систематически отбирались и были идентифицированы новые сигнальные пептиды для *P. pastoris*. Интересно, что у восьми сигнальных пептидов были более высокие значения индекса потенциала секреторного пептида D-score по сравнению с показателем  $\alpha$ -фактора *S. cerevisiae*, в то время как три сигнальных пептида показали самые высокие значения D-score: MKILSALLLLFTLAFA (D = 0,932), MRPVLSLLLLLASSVLA (D = 0.932) и MFKSLCMLIGSCLLSSVLA (D = 0,918) соответственно. Исходя из этого, авторы выбрали пять SP (D-score > 0,8) для получения рекомбинантных гормонов роста человека (rhGH). Для сравнения, SP23 показал наивысшую производительность [62]. Результаты показывают, что построенная библиотека сигнальных пептидов довольно полезна для индивидуального тестирования сигнальных пептидов по отношению к конкретным ферментам, особенно в связи с неясной корреляцией между эффективностью секреции и физико-химическими свойствами сигнальных пептидов. Кроме того, недавние исследования по продукции трипсина из *Streptomyces griseus* в дрожжах *P. pastoris* показали, что N-концевая последовательность влияет на эффективность секреции и ферментативные свойства. Таким образом, разработка новых коротких синтетических сигнальных пептидов также является перспективным направлением оптимизации экспрессии рекомбинантных белков.

## Основные стратегии направленного введения геномных изменений.

Существует несколько основных стратегий направленного введения в геном метилотрофных дрожжей экспрессионных кассет рекомбинантных белков [82]. Далее мы приведем некоторые из них, их преимущества и недостатки, а также основные трудности в их осуществлении:

Введение интеграционных кассет на основе маркеров антибиотико-резистентности и ауксотрофии по отдельным метаболитам.

Метод редактирования геномов применяется в качестве классических инструментов для создания рекомбинантных штаммов *P. pastoris*. Сайт-специфическая интеграция генов и их нокаут достигались путем гомологичной рекомбинации. Для этого создавали плазмиды, содержащие селективный маркер, способный к комплементации дефектного гена у *P. pastoris*. Например, в качестве селективных маркеров часто используются гены HIS4, URA3 и URA5 в соответствующих дефектных штаммах *P. pastoris* или гены, придающие устойчивость к антибиотикам, таким как Zeocin™, генетицин (G418) и бластоцидин S.

Так, в работе [92] разработали вектор, который позволяет проводить замену генов, т.н. pop-in/pop-out у *P. pastoris*. Этот вектор, называемый *pPOP*, рисунок 1, содержит ген ARG4 *S. cerevisiae* для положительного отбора и ген T-urf13 для негативного отбора, поскольку продукция этого гена вызывает чувствительность к действию пестицида метомила, которая отсутствует у дрожжей дикого типа. Сильная конститутивная экспрессия T-urf13 обусловлена GAP промотором и терминатором транскрипции гена AOX1 от *P. pastoris*.

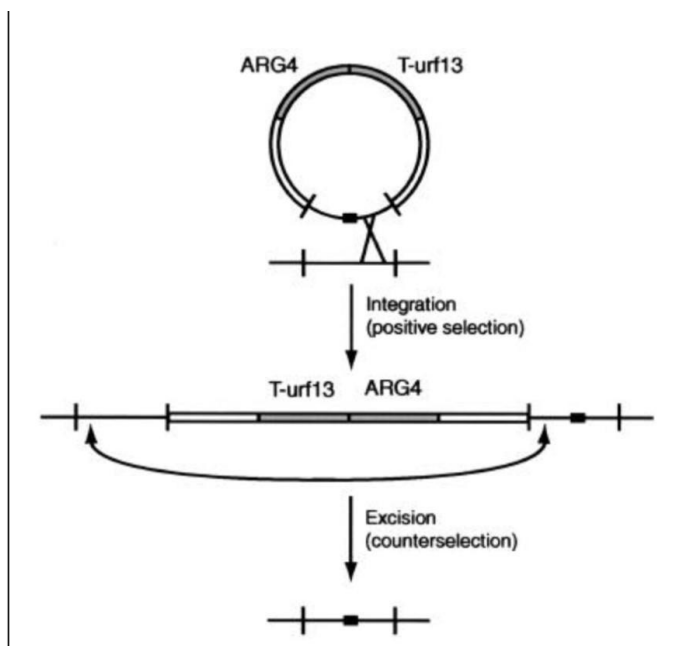


Рисунок 1 – Схема создания экспрессионных кассет с вектором pPOP

Недавно представленный набор для экспрессии PichiaPink™ для внутриклеточной или секретлируемой экспрессии позволяет легко выбирать многокопийные интеграционные клоны по различиям в формировании цвета на основе штаммов с нокаутом *ade2* и усеченных ADE2 промоторов различной силы перед маркерным геном ADE2.

Компания BioGrammatics (Карлсбад, Калифорния, США) разрабатывает векторы и экспрессионные штаммы *P. pastoris*, а также предоставляет векторы GlycoSwitch® для гуманизированного гликозилирования целевых белков.

Лаборатория Джеймса Крегга в Институте выпускников Кека, Клермонт, Калифорния, США, разработала набор плазмид для секреции белка и внутриклеточной экспрессии у *P. pastoris*, содержащих сильный промотор AOX1. Эти векторы основаны на различных маркерах ауксотрофии, таких как ARG4, ADE1, URA3 и HIS4, для отбора, требующих использования соответствующих штаммов-хозяев. Векторы содержат сайты рестрикции для линейаризации внутри маркерных генов для нацеливания кассет экспрессии на желаемый локус, а также для интеграции с несколькими копиями. Кроме того, был применен набор интеграционных векторов для последовательного разрушения ARG1, ARG2, ARG3, HIS1, HIS2, HIS5 и HIS6 у *P. pastoris*, для разработки пути гликозилирования белка.

В Институте молекулярной биотехнологии, Университет Граца Технологический институт Австрии, разрабатывает векторы *P. pastoris* через так называемый ‘Pichia Pool’. Плазмиды pPr содержат векторы, включающие промоторы генов GAP или AOX1, и, для секреторной экспрессии,  $\alpha$ -фактор *S. Cerevisiae* ( $\alpha$ -MF) сигнал секреции. Кассеты маркеров отбора антибиотиков помещены под контроль промоторов генов ADH1 или ILV5 в векторах pPrV1 и pPrT4 соответственно [82].

Для *P. pastoris* в целом характерно меньшее количество разработанных штаммов-ауксотрофов, неспособных выживать без определенного компонента в среде [77; 82]. Основные штаммы приведены в таблице 2. Однако при использовании подобных методик экспрессионные кассеты селективных маркеров обычно остаются в организме хозяина, что нежелательно для последующих генетических манипуляций и промышленного применения. Данная стратегия является основной при разработке систем экспрессии белков для исследования, требующего быстрого введения определенных генов.

Таблица 2- Штаммы ауксотрофов *Pichia pastoris*

Штамм	Генотип		Фенотип	Источник
GS115	his4		His <sup>-</sup>	Life Technologies™
PichiaPink™	ade2		Ade <sup>-</sup>	Life Technologies™
KM71	his4, aox1::ARG4, arg4		His <sup>-</sup> , MutS	Life Technologies™
KM71H	aox1::ARG4, arg4		MutS	Life Technologies™
BG09	arg4::nourseoR $\Delta$ lys2::hygR		Lys <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , NourseothricinR , HygromycinR	BioGrammatics
GS190	arg4		Arg <sup>-</sup>	[20]
GS200	arg4 his4		His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup>	[99]
JC220	ade1		Ade <sup>-</sup>	[20]
JC254	ura3		Ura <sup>-</sup>	[20]
JC227	ade1 arg4		Ade <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup>	[73]
JC300-JC308	Combinations of ade1 arg4 his4 ura3		Combinations of Ade <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Ura <sup>-</sup>	[73]
YJN165	ura5		Ura <sup>-</sup>	[72]
CBS7435 his4	his4		His <sup>-</sup>	[30]
CBS7435 his4 MutS	aox1, his4		MutS , His <sup>-</sup>	[30]

продолжение таблицы 2

CBS7435 MutS arg4	aox1, arg4		MutS , Arg <sup>-</sup>	[30]
CBS7435 met2a	met2		Met <sup>-</sup>	[77]
CBS7435 met2 arg4a	met2 arg4		Met <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup>	[77]
CBS7435 met2 his4a	met2 his4		Met <sup>-</sup> His <sup>-</sup>	[77]
CBS7435 lys2a	lys2		Lys <sup>-</sup>	[77]
CBS7435 lys2 arg4a	lys2 arg4		Lys <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup>	[77]
CBS7435 lys2 his4a	lys2 his4		Lys <sup>-</sup> His <sup>-</sup>	[77]
CBS7435 pro3a	pro3		Pro <sup>-</sup>	[77]
CBS7435 tyr1a	tyr1		Tyr <sup>-</sup>	[77]

Теоретически, основываясь на данных для винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для *P. pastoris* возможно создание большего количества штаммов-ауксотрофов.

Введение интеграционных кассет на основе сайт-специфической рекомбинации.

Для реализации эффективной работы генома и создания штаммов, не содержащих маркеров, для геномной инженерии *P. pastoris* была применена система модификации, на основе рекомбиназы F<sub>1</sub>p из дрожжевой 2μ-плазмиды и двух коротких повторяющихся последовательностей FRTs, которые являются мишенью F<sub>1</sub>p. После экспрессии фрагменты ДНК, расположенные между двумя инвертированными повторяющимися последовательностями (FRT), были удалены. В результате сохранился один фрагмент FRT длиной 34-й п.о. FRTs являются асимметричными участками и имеют обратную ориентацию относительно друг друга, поэтому взаимная рекомбинация, стимулируемая F<sub>1</sub>p, приводят к инверсии последовательностей между FRTs. При этом ориентация FRTs как прямых повторов приводит к опосредованной белком F<sub>1</sub>p делеции всей ДНК между FRTs. Введение в последовательность биосинтетического гена, такого как LEU2, между одинаково ориентированными FRTs приводит к потере гена, что поначалу использовалось для контроля активности F<sub>1</sub>p *in vivo*. Биохимические свойства рекомбиназ, таких как F<sub>1</sub>p, хорошо изучены. Эти ферменты не требуют белковых факторов или кофакторов, и нуждаются только в моно- или двухвалентных катионов. Система рекомбиназы F<sub>1</sub>p успешно используется в *E. coli*, и позднее было показано, что она может быть использована как для *S. cerevisiae*, так и для *P. pastoris* [18].

Аналогичным образом, система Cre-loxP, которая была разработана для *S. cerevisiae*, была успешно опробована в *P. Pastoris*, рисунок 2. Cre - это сайт-специфичная рекомбиназа, которая специфически распознает и рекомбинирует гены между двумя локусами loxP. Преимущество этой технологии заключается в том, что гены устойчивости к антибиотикам могут быть сначала использованы для создания нужных штаммов, а затем удалены. Однако, при этом сайт loxP остается в целевом сайте, что может привести к непредсказуемой рекомбинации.

Для создания набора методов встречного отбора при редактировании генома без маркеров у *P. pastoris* был использован *mazF*, токсичный ген из *E. coli*. В дополнение к методу Cre-Lox была разработана новая система. Для облегчения интеграции вектора могут быть использованы три рекомбиназы - VxbI, R4 и Tr901-1. Для целенаправленной интеграции в геном штамма *P. pastoris* была предварительно введена «посадочная площадка» гетерологичных ДНК. Система обеспечивала высокую эффективность, а с помощью «посадочной площадки» создавался дополнительный барьер от нецелевых модификаций. Следует отметить, что использование «посадочной площадки» требует предварительной работы и ограничивает спектр применения. Однако интересным аспектом представленного подхода является его возможность расширения для разработки синтетических генов. Генные цепи состоят из генов, окруженных сайтами распознавания рекомбиназы, которые позволяют инвертировать ген, чтобы включить или выключен его экспрессию. Эта технология может оказаться полезной в будущем [18].

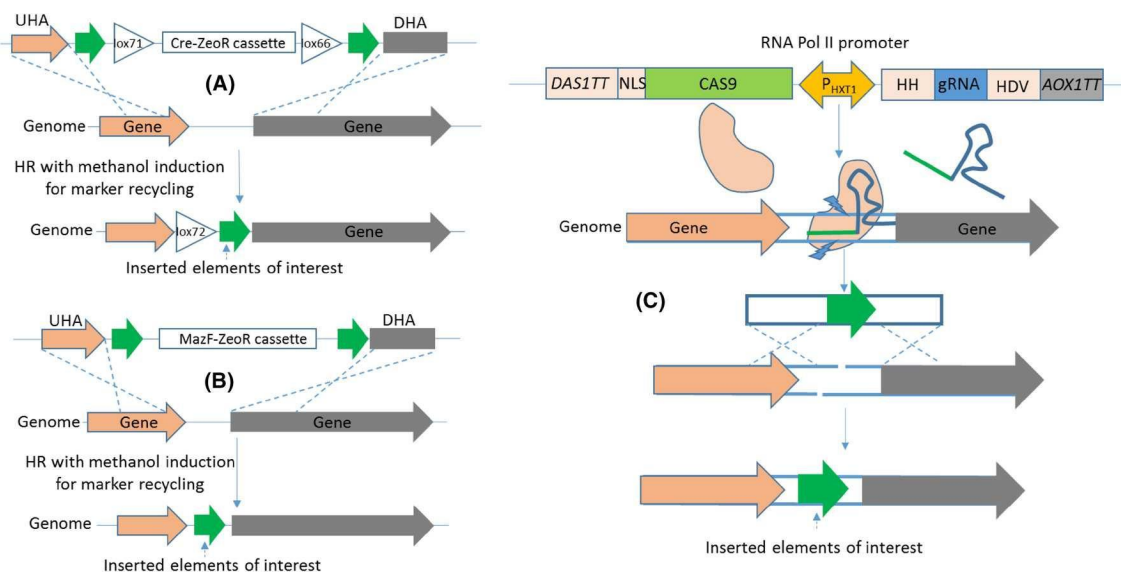


Рисунок 2 – а) Общая схема Cre-loxP системы в *P. pastoris* б) модификация с системы с выключением гена MazF

По сравнению с *S. cerevisiae*, *P. pastoris* обладает менее эффективной системой гомологичной рекомбинации. У *S. cerevisiae* эффективность рекомбинации может быть близка к 100% при гомологичном перекрытии фланкирующих фрагментов 50 п.н. Однако, для *P. pastoris* гомологичное перекрытие фланкирующих фрагментов до 1000 п.н. может привести к рекомбинации с частотой не более 10-30%. Чтобы повысить эффективность гомологичной рекомбинации у *P. pastoris*, Näätäsaari и др. идентифицировали и удалили гомолог KU70 *P. pastoris*, который кодирует ключевой белок в системе негомологичной рекомбинации, что увеличило частоту гомологичной рекомбинации более чем на 90%, при наличии 250 п.н. гомологичных фланкирующим областям целевого локуса. Во время нескольких циклов культивирования не наблюдалось серьезной задержки роста или снижения числа копий генов. Таким образом, штамм Δku70 может быть использован в качестве платформы для производства белка и исследований в области синтетической биологии [30]. Для введения программируемых разрывов в интересующих позициях генома, Венингер и др. систематически исследовали и оптимизировали комбинации совместной сверхэкспрессии нуклеазы Cas9 и направляющей РНК (gRNA) под контролем промоторов РНК-полимеразы III и II [21]. Кроме того, последовательность ядерной локализации (NLS) была объединена с Cas9, чтобы гарантировать его активность в ядре.



Кроме вышеперечисленных стратегий по геномному редактированию методом сайт-специфической рекомбинации, существует метод сайт-специфической рекомбинации на основе PhiC31 интегразы [21]. Так, при тестировании различных фаговых сериновых интеграз отмечено, что PhiC31 и некоторые другие фаговые сериновые интегразы могут быть использованы для замены селективного маркера методом сайт-специфической рекомбинации [107].

Системы редактирования генома на основе CRISPR/Cas9.

Современные инструменты редактирования генома, такие как ZFN (цинковые пальцевые нуклеазы), TALEN (эффекторные ядра, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR/Cas, произвели революцию в возможностях генетических манипуляций с различными клетками, в том числе и микробов, рисунок 3.

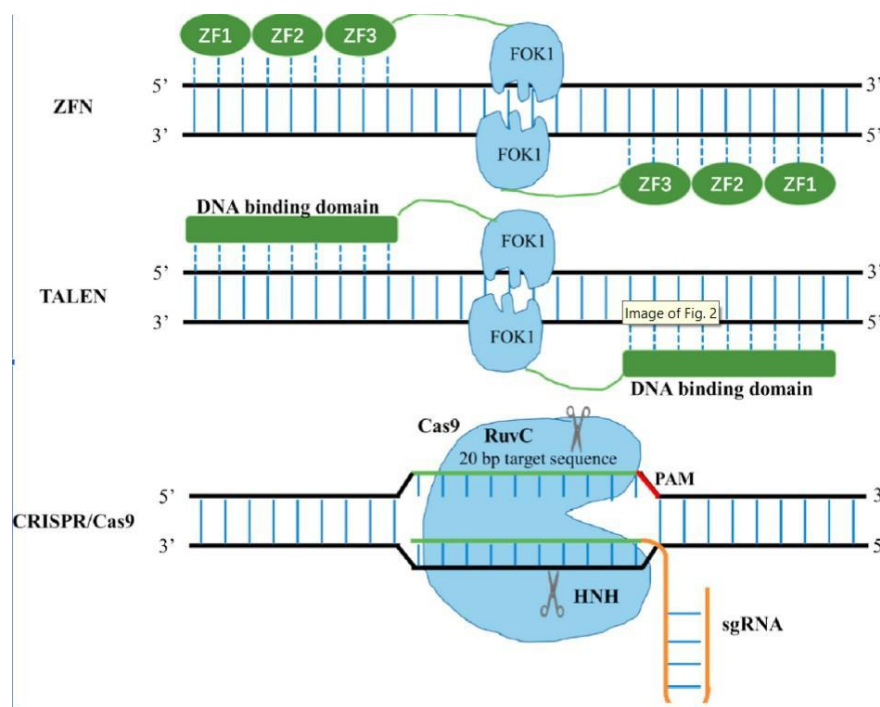


Рисунок 3 – Схематичное изображение принципов технологии геномного редактирования ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9

Эти технологии используют специфические нуклеазы для создания двухцепочечных разрывов (DSB) в соответствующих локусах, которые восстанавливаются путем гомологичной рекомбинации (HR) или негомологичного соединения концов (NHEJ) для достижения желаемого редактирования генома. В частности, система CRISPR/Cas является наиболее широко используемой и наиболее мощной технологией редактирования генома. Система CRISPR/Cas9 является производной от систем иммунной защиты бактерий и архей и активно изучалась в т.ч. с целями разработки фабрик микробных клеток, селекции растений, разведения животных, моделирования заболеваний и биотерапии. Венингер и др. систематически оптимизировали систему экспрессии CRISPR/Cas9 для достижения эффективного и точного редактирования генома в *P. pastoris*, включая, но не ограничиваясь кодирующими последовательностями Cas9, последовательностями gRNA, структурами gRNA (т.е. с последовательностями рибозима) и промоторами для экспрессии Cas9 и gRNAs. Из 95 комбинаций только 6 конструкций оказались функциональными для редактирования генома, что указывает на необходимость дальнейшей оптимизации, таблица 3. [21]

Таблица 3- Системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома *P. Pastoris*

Cas9 промотор	sgRNA промотор, тип промотора	Штамм	Мишень	Длина донора, п.о.	Эффективность
pHTX1	pHTX1,II	CBS4735	GUT1	1000	87-94%
pENO1	ptRNA-tRNA1,III	NRRL Y-11430	GUT1	500	95%
pHTX1	pHTX1,II	GS115 Δku70	2 локуса	1000	57,7-70%
pHTX1	pHTX1,II	GS115 Δku70	3 локуса	1000	12,5-32%
pGAP	pHTX1,II	GS115	MXR1	~600	>80%
pGAP	pSER, III	GS115	ADE2	250	80%
pGAP	pHTX1,II	GS115	Gt1	Нет	100%
pHTX1	pHTX1,II	CBS4735 Δku70	GUT1	1000	78-91%
pHTX1	pHTX1,II	CBS4735 Δku70	GUT1	1000	80-95%
pHTX1	pHTX1,II	CBS4735 Δku70	GUT1	1000	100%
pHTX1	pHTX1,II	KM71	PDC1	1000	N.A.

Было обнаружено, что редактирование генома *P. pastoris* на основе Cas9 имело низкую эффективность, особенно когда экспрессия гРНК находилась под контролем промоторов РНК-полимеразы III. Было высказано предположение, что эффективность CRISPR/Cas9 в основном ограничивается низкой стабильностью плазмиды (чтобы управлять экспрессией компонентов CRISPR эндонуклеазой активности) и низкой эффективностью гомологичной рекомбинации (для

восстановления двойной ДНК разрыв нити) у *P. pastoris*. Для увеличения эффективности системы редактирования CRISPR были проанализированы различные варианты эписомальных плазмид, так как использование оптимальной эписомальной плазмиды позволит увеличить эффективность редактирования. Хотя эффективность трансформации и количество копий PARS1 и panARS было сопоставимым, улучшенная стабильность плазмиды резко повысила эффективность системы редактирования генома на основе CRISPR / Cas9. В рамках проведенного исследования было проанализировано пять разных ARS, включая PARS1, panARS, mitoARS, PpARS2, а также ARS из центромерной плазмиды pRS416 (ScARS) *Saccharomyces cerevisiae*. Данные ARS были клонированы или синтезированы для построения эписомальных векторов экспрессии gRNA и Cas9. Тогда как эффективность трансформации, стабильность и число копий этих плазмид оставалось неизменным, изменялся лишь ARS для определения оптимального. Наиболее эффективным вариантом оказалось использование panARS, который и был использован для разработки системы CRISPR/Cas9. Использование panARS позволило достичь результата при использовании CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования генома в случае, когда экспрессия направляющей РНК (sgRNA) управлялась промотором типа III (промотор SER) у *P. pastoris* [23].

Установлено, что замена источника репликации несущей плазмиды с PARS1 на panARS увеличила эффективность дизрупции локуса ADE2 с ~10% до ~80% . Кроме того, Далви и др. разработал стратегию, основанную на секвенировании, для создания специфичных для штамма кассет для модульной и эффективной экспрессии gRNAs и добился высокой эффективности редактирования генома до 95% [90]. Помимо дизрупции индивидуальных генов, мультиплексная интеграция гетерологичных генов является еще одним важным инструментом синтетической биологии для создания *P. pastoris* в качестве клеточных фабрик для индустриально-значимых продуктов. Одновременная интеграция нескольких генов была реализована в штамме *P. pastoris* с делецией KU70, при этом эффективность интеграции варьировала от 57,7% до 70% и 12,5%-32,1% для интеграции в 2 и 3 локуса соответственно.

Использование систем, основанных на транспозонах для геномного редактирования *P.pastoris*.

Скрининг на основе транспозонов PiggyBac (выделенный из капустной моли *Trichoplusia ni*) на основе транспозонов стал мощным функциональным подходом к идентификации функциональных генов у млекопитающих [33], благодаря своей сверхвысокой эффективности

транспонирования. Недавно система мутагенеза piggyBac была также успешно сконструирована для *Schizosaccharomyces pombe* [60]. Однако она никогда не применялась в *P. pastoris*, частично из-за ее меньшей «значимости» по сравнению с традиционными модельными видами дрожжей, такими как *S.* и *Schizosaccharomyces pombe*. С другой стороны, как одна из наиболее важных систем экспрессии, *P. pastoris* действительно требует новых инструментов для создания библиотек мутагенеза и исследования регуляторных механизмов и оптимизация системы экспрессии.

Была разработана система двух плазмид, которая может эффективно генерировать мутанты за счет использования транспозонов PiggyBac в *P. pastoris*. Было оценено качество этой системы мутагенеза с помощью простого скрининга функциональных генов, участвующих в репрессии углеродных катаболитов *P. Pastoris* [78]. Таким образом, было показано, что транспозон-опосредованный мутагенез может быть надежным инструментом для функционального скрининга генов у *P. Pastoris* [78].

#### 1.2.2 Создание вектора для экспрессии CRISPR/Cas9 системы в *Pichia pastoris*

Для тестирования векторов экспрессии CRISPR/Cas9 в дрожжах *P. pastoris* были отобраны следующие генетические конструкции: pBG\_HygpLAT1\_Cas9, рисунок 4, и pBG\_G418\_pTEF1\_Cas9, рисунок 5. Эффективность данных конструкций была проверена при создании штамма-ауксотрофа по гену ADE2. Однако, текущий дизайн генетической конструкции не является окончательным, и не означает, что данный вариант является наиболее оптимальным. Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* разработаны наиболее часто используемые варианты плазмид [52]. Для метилотрофных дрожжей *P. pastoris* проводились исследования в поисках оптимальной генетической конструкции для применения системы CRISPR/Cas9 в *P. pastoris* [21; 50].

Было проведено системное исследование различных комбинаций использования оптимизированных последовательностей Cas9, различных направляющих РНК, вариантов совместного использования промоторов РНК-полимеразы III и промоторов РНК-полимеразы II в комбинации с различными рибозимами, однако эффективно работали только 6 вариантов из 95 функциональных конструкторов [21]. Одной из причин, по которым система CRISPR-Cas9 работает хуже в *P. pastoris*, чем в *Saccharomyces cerevisiae*, возможно, являются не отсутствие оптимальных конструкторов, а системные отличия в механизмах репарации. Так, использование

штамма  $\Delta ku70$  с делецией белка  $ku70$ , участвующего в репарации с нехомологичным соединением концов, позволяет повысить эффективность геномного редактирования методом CRISPR-Cas9 в *Pichia pastoris* [39].

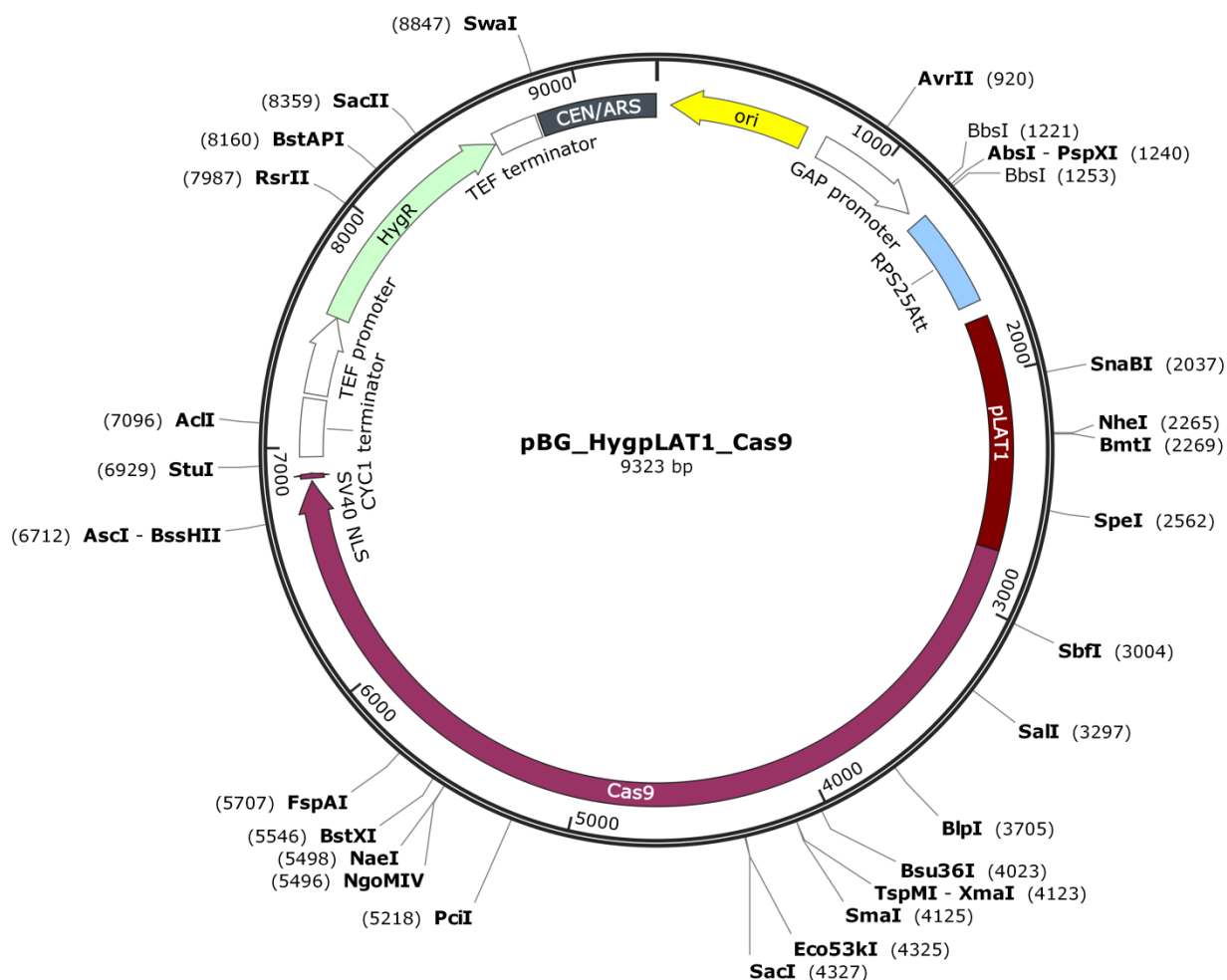


Рисунок 4 - Сборный вектор для экспрессии направляющей РНК и Cas9 под конститутивным промотором pLAT1, данный вектор общей длиной 9323 п.о. состоит из следующих элементов:

- а) Ori – - бактериальная точка начала репликации;
- б) GAP promoter – конститутивный промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы;
- в) Участок для вставки направляющей РНК по сайтам рестрикции BbsI;
- г) Терминатор транскрипции RPS25Att;
- д) pLAT1 – конститутивный промотор транспортера L-аминокислот;
- е) Cas9 – ген РНК-зависимой эндонуклеазы, оптимизированный под экспрессию в *H. sapiens*;
- ж) SV40 NLS – ген сигнал ядерной локализации;
- з) Терминатор транскрипции CYC1;
- и) TEF promoter – конститутивный промотор фактора элонгации 1;

- к) *HygR* – ген резистентности к антибиотику гиромоцину В;  
 л) TEF terminator – терминатор транскрипции фактора элонгации 1;  
 м) CEN/ARS – последовательность для автономной репликации в клетках дрожжей.

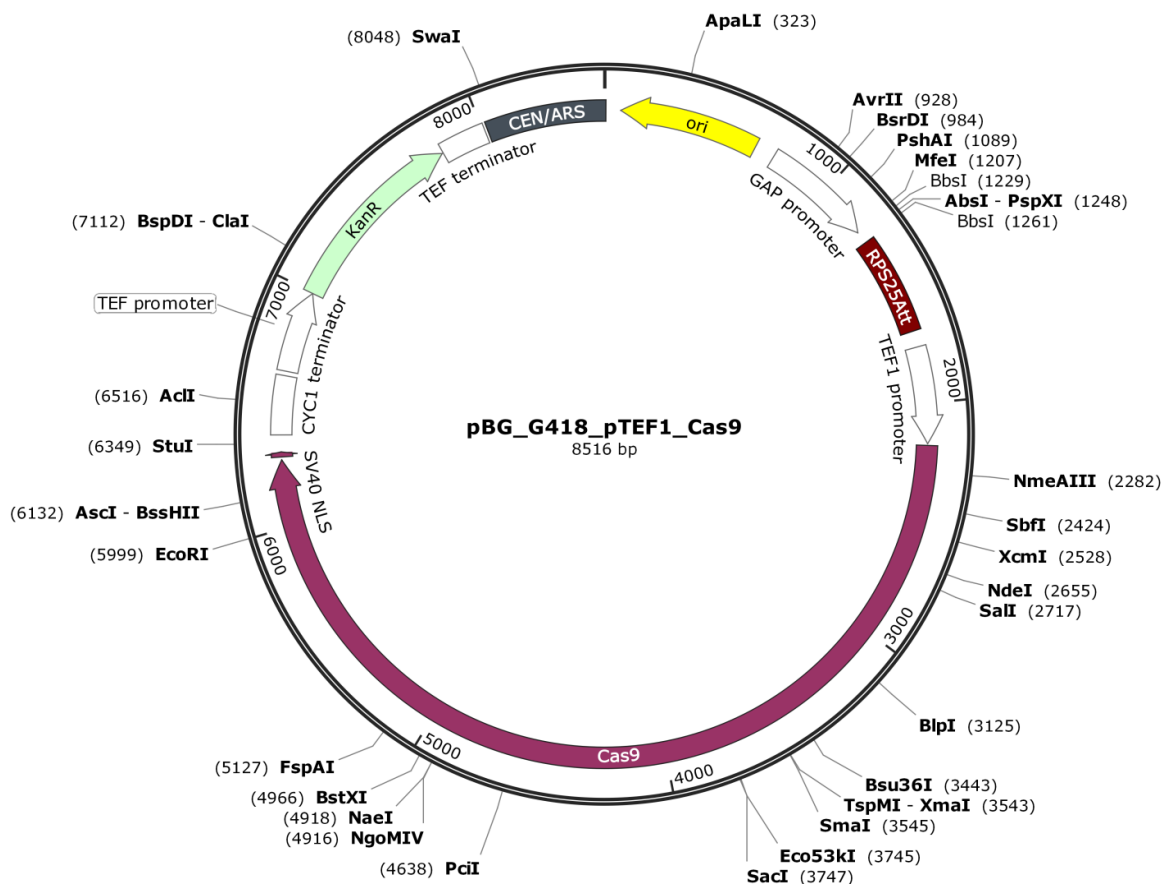


Рисунок 5 - Сборный вектор для экспрессии генов *HygR* и *Cas9* под конститутивным промотором *pTEF1*, данный вектор общей длиной 8516 п.о. состоит из следующих элементов:

- а) Ori – бактериальная точка начала репликации;
- б) GAP promoter – конститутивный промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы;
- в) Участок для вставки направляющей РНК по сайтам рестрикции *BbsI*;
- г) Терминатор транскрипции *RPS25Att*;
- д) *pTEF1* – конститутивный промотор фактора элонгации 1;
- е) *Cas9* – ген РНК-зависимой эндонуклеазы, оптимизированный под экспрессию в *H. sapiens*;
- ж) SV40 NLS – ген сигнал ядерной локализации;
- з) Терминатор транскрипции *CYC1*;
- и) TEF promoter – конститутивный промотор фактора элонгации 1;
- к) *KanR* – ген резистентности к антибиотику генетицину G418;
- л) TEF terminator – терминатор транскрипции фактора элонгации 1;
- м) CEN/ARS – последовательность для автономной репликации в клетках дрожжей.

*Создание плазмид для нокаута генов ADE2, LEU2, MET8 методом геномного редактирования CRISPR/Cas9*

Для создания вставки, кодирующую направляющую ДНК, использовали систему из 6 праймеров, перечисленных в таблице 4.

Таблица 4 - Праймеры для сборки вставки, кодирующей НН-гРНК-HDV

Праймер	Последовательность
A_sgRNA_struc_rev	CGCCATGCCGAAGCATGTTGCCAGCCGGCGCCAGCGAGGAGGCTGG GACCATGCCGGCC
B_sgRNA_struc_rev	agaagacgcaagcaGTCCAAAGCTGTCCCATTCGCCATGCCGAAGCATGTTGC CCAGCCG
C_sgRNA_struc_rev	AGGCTGGGACCATGCCGGCCAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTTC AAGTTGA ТААСГ
D_sgRNA_struc_fw	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA АСТТГАА АААГТ
ADE2_sg1	TGAAGACGC                                                CATG                                                GTT                                                TGC CTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC
ADE2_sg2	AAACGAGTAAGCTCGTCGCAAACCTTCTCGGCATACAAGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAG

Сборка осуществлялась за один раунд ПЦР с следующими параметрами 98°C/30 s, 35 циклов 98 °C /10 с, 60 °C /20 с, 72 °C /10 с и 72°C 2 мин. Правильно собранный продукт имел размер 250 п.о., правильность сборки подтверждалась электрофорезом. Полученный ПЦР фрагмент разбавляли до концентрации 40 пМ для последующего клонирования.

На этом этапе осуществляется дизайн вставки, кодирующей место двухцепочечного разрыва. Варианты праймеров sg1 и sg2 для создания нокаутов  $\Delta Ade2$ ,  $\Delta Leu2$ ,  $\Delta Met8$  представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Праймеры для сборки направляющей РНК

Редактируемый ген	Праймеры, кодирующие sg1 и sg2	Целевая последовательность
ADE2 (1)	<b>Sg1:TGAAGACGCCATGGTTTGCCTGATGAGTCC GTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC</b> <b>sg2:AAACGAGTAAGCTCGTCGCAAACCTTCTCGG CATACAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG</b>	<b>GCAAACCTTCTCGGCATA CAAAGG</b>
ADE2 (2)	<b>Sg1:TGAAGACGCCATGAATCGACTGATGAGTCC GTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC</b> <b>Sg2:AAACGAGTAAGCTCGTCTCGATTGTCCAAATGC CTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG</b>	<b>TCGATTGTCCAAATGCC TAGAGG</b>
ADE2 (3)	<b>Sg1:TGAAGACGCCATGTACCTGCTGATGAGTCCGT GAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC</b> <b>Sg2:AAACGAGTAAGCTCGTCCAGGTAATAGGTATTC TAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG</b>	<b>CAGGTAATAGGTATTCT AGGAGG</b>
LEU2	<b>Sg1:tgaagacgccatgTTATTGCTGATGAGTCCGTGAGGA CGAAACGAGTAAGCTCGTC</b> <b>Sg2:AAACGAGTAAGCTCGTCCAATAATTCAGCAC CAACGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG</b>	<b>CAATAATTCAGCACCAAC GTGG</b>
MET8 8	<b>Sg1:TGAAGACGCCATGACCCAACTGATGAGTCCGT GAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCTTGG</b> <b>Sg2:AAACGAGTAAGCTCGTCTTGGGTCAGTAGTA AGACAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG</b>	<b>TTGGGTCAGTAGTAAGA CAGGGG</b>

На этапе дизайна праймеров для введения гидовой РНК проверили соответствие и местоположение участка генома, комплементарного направляющей РНК. Для проверки делеции были созданы соответствующие праймеры для детекции делеции по последовательности ДНК из генома. Сервис <https://chopchop.cbu.uib.no/> подходит не только для детекции целевых последовательностей для редактирования, но и для создания проверочных праймеров для секвенирования участка генома. Так ADE2 делецию детектировали в участке chr3:2053833, таблица 6.



Таблица 6 - Праймеры для амплификации фрагмента гена в области делеции для последующего секвенирования

Редактируемый ген	Праймеры для амплификации фрагмента гена в области делеции		Целевая последовательность
ADE2 (1)	LRNA2ADE2 GTGTTCCCTGTCAAGGGCTCTAC	RRNA2ADE2 TACTTGGACATTTCC CTTTTGCC	<b>GCAAACCTTCTCGG CATACAAAGG</b>
ADE2 (2)	LRNA2-ade2 GTGTTCCCTGTCAAGGGCTCTAC	RRNA2-ade2 TACTTGGACATTTCC CTTTTGCC	TCGATTGTCCAAAT GCCTAGAGG
ADE2 (3)	LRNA3-ade2 CGTATACTCGGTAGTGTGCTCG	RRNA3-ade2 CAGCATTAATGTGCG TTAGCAGG	<b>CAGGTAATAGGTAT TCTAGGAGG</b>
LEU2	TCCGAACCAATTACCAAGAAA C	CAGCTCCTCCGATT AGTTGAGT	<b>CAATAATTTTCAGCAC CAACGTGG</b>
MET8	AGATGGAGCAAATAGAACAGG C	GGCAAGTAGAGGT TCCAGCTTA	<b>TTGGGTCAGTAGT AAGACAGGGG</b>
AOX1	AOX1_Seq1_fw TAATGTACATAGATCTTGAGAT AAATTTACGTTTA	AOX1_Seq1_rev ATGAGACTGAGGT TTCATGAGTC	<b>CTAGGATATCAAA CTCTTCG</b>

***Клонирование по Голден Гейт вставки направляющей РНК в плазмиду pBG\_G418\_pTEF1\_Cas9***

Полученный продукт имеет сайты F<sub>s</sub>2 (CATG) и F<sub>s</sub>3 (GCTT) на 5'- и 3'- концах соответственно, распознаваемые рестриктазой BpI. Далее по Голден Гейт лигировали собранный FS2-250bp-Fs3 в вектор pBG\_G418\_pTEF1\_Cas9 при помощи реакции лигирования. Реакционная смесь для лигирования состоит из:

- 1 мкл рестриктазы BpI (10 U),
- 0.1 мкл T4 -лигазы (40 U),

2 мкл буфера CutSmart® Buffer (10x, NEB),

2 мкл АТФ (10 mM, NEB),

1 мкл 40 нМ разбавленного фрагмента НН-гРНК-HDV и вектора pBG\_G418\_pTEF1\_Cas9.

Общий объем - 20 мкл.

Сборка по Голден Гейт происходила за 20 циклов с параметрами: каждый цикл 2 мин при 37 °С, 2.5 мин при 16 °С, 10 мин при 37 °С, 30 мин при 55 °С, 10 мин при 80 °С. Полученную плазмиду проверили рестрикцией соответствующими ферментами и секвенированием по Сенгеру, рисунок 6.

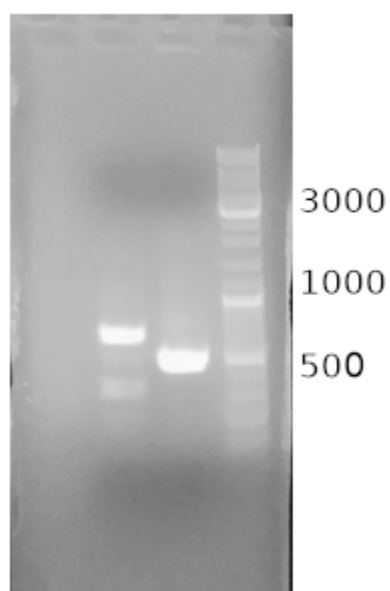


Рисунок 6 - Проверка с помощью ПЦР вставки участка направляющей РНК под ADE2 в вектор pBG\_G418\_pTEF1\_Cas9 по методу Golden gate с помощью праймеров gRNACheck\_for, gRNACheck\_rev по краям от вставки. Вектор pBG\_G418\_pTEF1\_Cas9 с вставкой фрагмента направляющей РНК(длинный фрагмент 650 пн) и без направляющей РНК (короткий фрагмент около 450 пн, вторая лунка)

Необходимо пара праймеров для проверки вставки. Была подобрана универсальная пара для проверки вставки гидовой РНК:

gRNACheck\_for CGTTACCGTCCCTAGGAAAT

gRNACheck\_rev GGCTGAAACCTTCGATGAAC

После успешной сборки вставки с направляющей РНК в плазмиду sgRNA/Cas9, около

0.5-1 мкг нелинеаризованной плазмиды трансформировали в электрокомпетентные клетки и высевали на селективный агар YPD с G418 (100 мкг/мл). После этого чашки инкубировали при 30°C 48 часов.

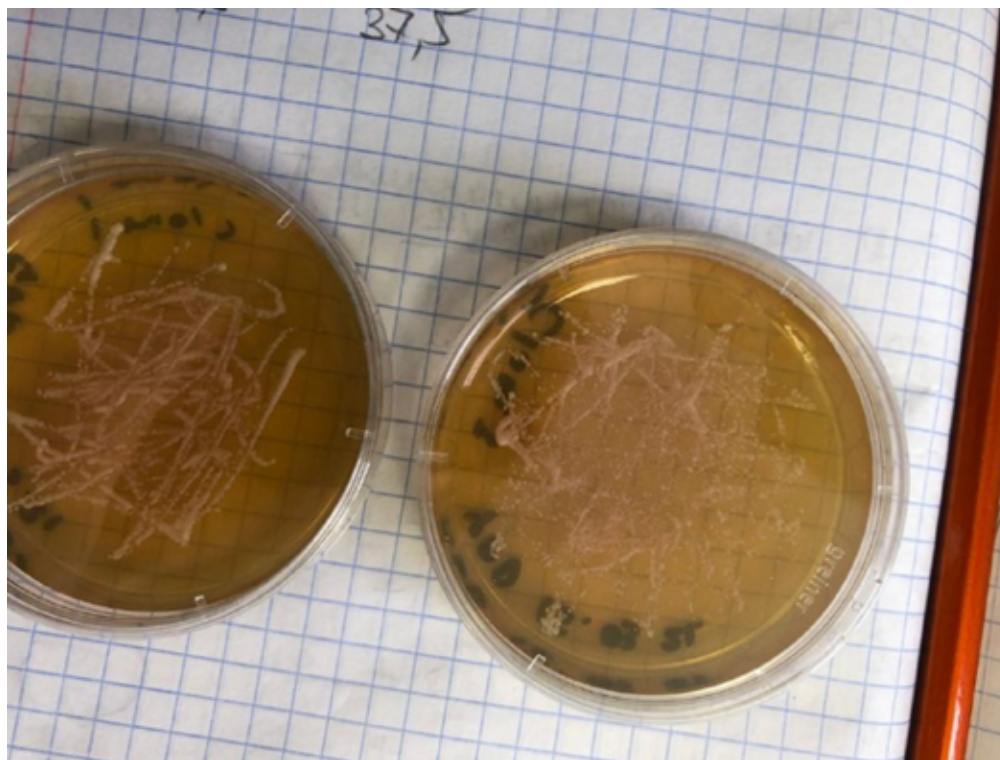
Клетки пересаживали дважды и более раз (48 часов каждую) на чашках YDG с антибиотиком G418 (100 мкг/мл).

Из каждой отселектированной колонии стерильной зубочисткой отбирали небольшое количество клеток и ресуспендировали в 10 мкл 0.02 М NaOH в реакционной 0.5мл пробирке. Смесь кипятили 10 мин при 99 °C и затем остужали. После короткого осаждения (1 мин, 12000 об/мин) на центрифуге Minispin (Eppendorf), 2 мкл смеси используют в качестве матрицы для ПЦР с колоний.

Ампликоны, полученные при помощи ПЦР с колоний с соответствующими праймерами использовались для проверки делеций секвенированием по Сенгеру.

Клоны с внесенными мутациями пересаживали дважды на чашках с YPD агаром без селекционного давления G418 для потери эписомной плазмиды sgRNA/Cas9.

#### ***Проверка делеции ADE2 после проведения нокаута методом CRISPR/Cas9***



Колонии в фенотипом  $\Delta ADE2$ . Процент появления успешного фенотипа 2% от всех колоний.

Колонии с фенотипом  $\Delta ADE2$  появились после использования целевой последовательности 2 (sgADE2). Далее был проведен ПЦР с колоний с полученным фенотипом. Проверка генотипов полученных нокауты подтверждена секвенированием полученных ПЦР фрагментов локуса chr3:2053833, рисунок 7.

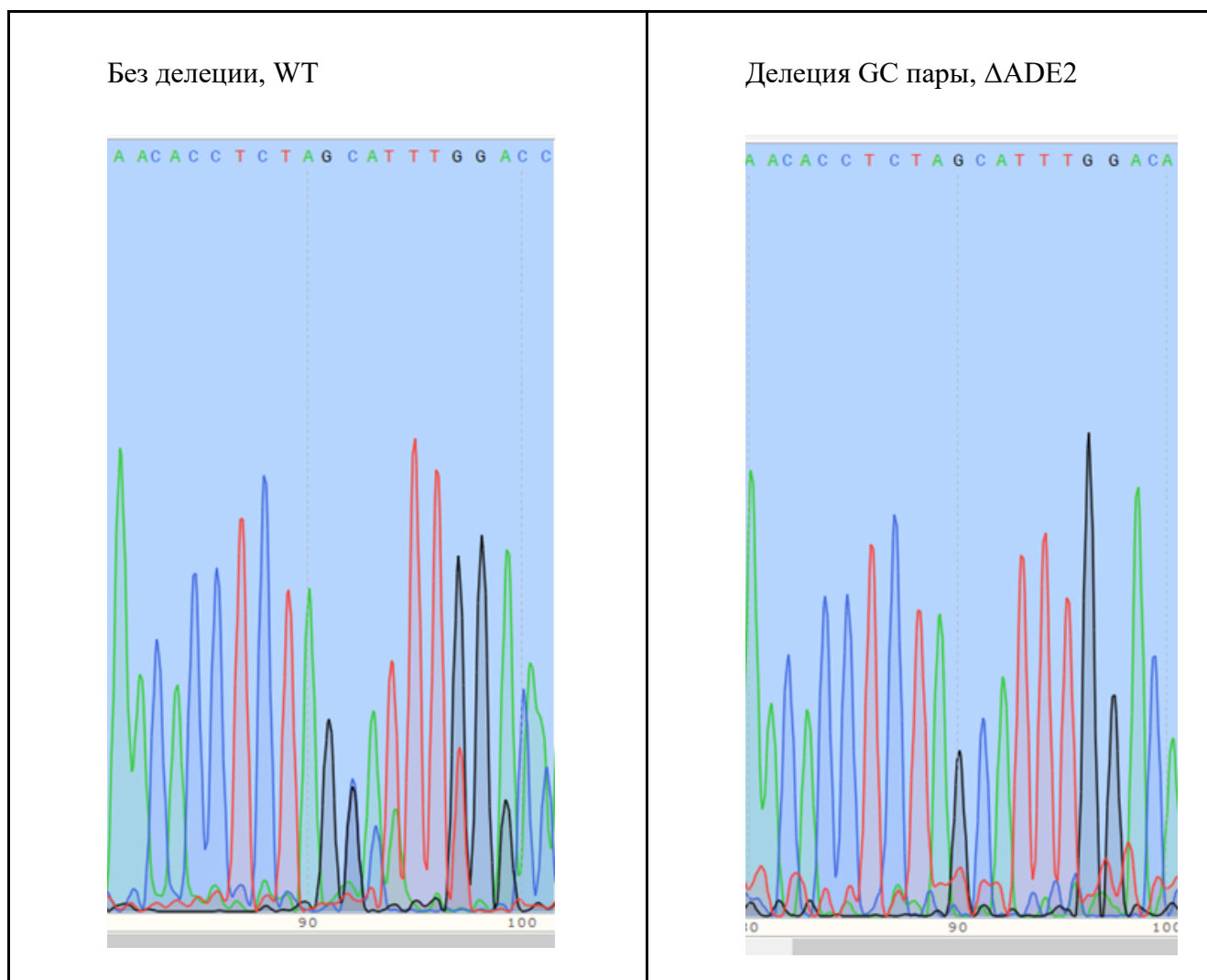


Рисунок 7 - Детекция делеции в гене ADE2 в локусе chr3:2053833 штамма X-33

### 1.2.3 Создание генетической конструкции для инактивации гена пути биосинтеза мочевины в штамме винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* I-328

ЭК – потенциальный канцероген, который образуется из мочевины при хранении вина, его содержание в пищевых продуктах регулируется нормами ЕС. Для получения штаммов, обладающих пониженной способностью к продукции мочевины, будет использован подход, основанный на инактивации генов пути ее биосинтеза – аргинин-пермеазы CAN1 и аргиназы CAR1. Ген CAN1 кодирует аргинин пермеазу, которая наряду с пермеазой аминокислот GAP1 отвечает за транспорт аргинина в клетки дрожжей из среды культивирования. В ходе дальнейших этапов катаболизма аргинин расщепляется аргиназой CAR1 до орнитина и мочевины, которая либо экскретируется с помощью пермеазы DUR4p либо трансформируется амидолиазами DUR1p/DUR2p до углекислоты и аммиака, рисунок 8. Снижение концентрации аргинина – катаболического предшественника мочевины, опосредованно приведет к снижению содержания ЭК в вине.

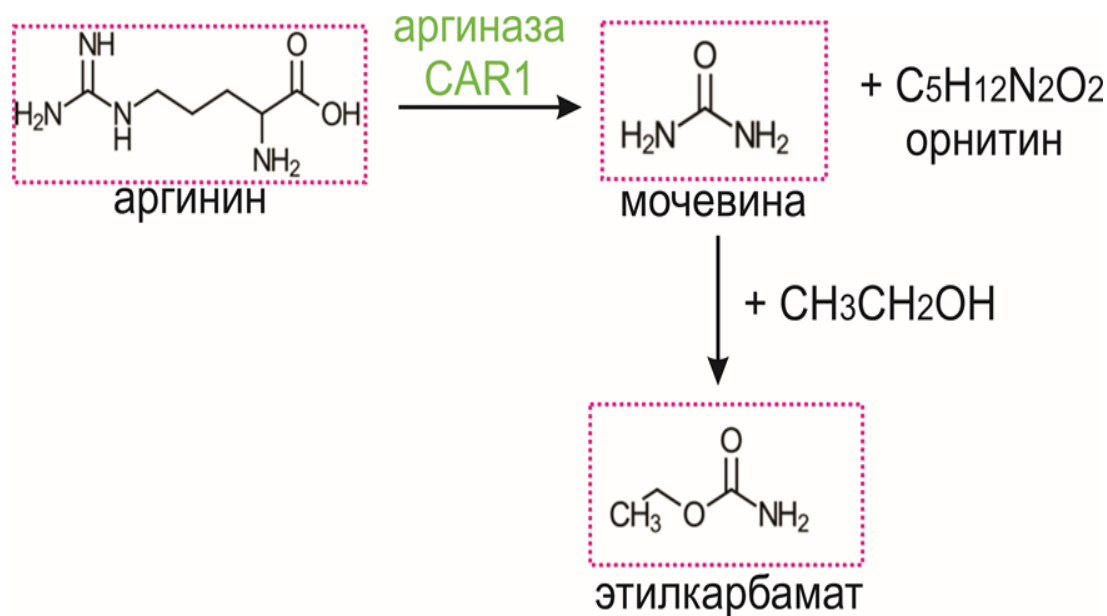


Рисунок 8 - Схема образования этилкарбамата в вине

Группа университетских ученых из Торонто и Милана получила производные винных штаммов EC1118 и AWRI1796 дефектные по обеим аллелям гена CAN1 [28]. ГМ штаммы винных дрожжей с изменениями в путях катаболизма аргинина уже получены для дрожжей,

используемых при производстве sake и хереса. Полученные рекомбинантные штаммы отличались пониженной продукцией мочевины при сохраненной способности к сбраживанию, хотя и несколько сниженной скорости роста. Преимущество внесения мутации в гена CAN1 по сравнению с другими способами модификации путей утилизации аргинина состоит в том, что такой прием менее чувствителен к колебаниям содержания источников азота в составе сусла и меньше сказывается на параметрах роста дрожжевых штаммов [28].

Для инактивации генов CAN1 и CAR1 будет использована процедура CRISPR/Cas9 – опосредованного геномного редактирования. Будет получено два отдельных штамма с делецией полного гена CAN1 или полного гена CAR1.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* традиционно используются в виноделии. В качестве основы для генно-инженерных модификаций был использован винный штамм дрожжей I-328. Данный штамм является коллекционным ВНИИ виноградарства и виноделия «Магарач» РАН и применяется в виноделии.

Делеция генов CAN1 и CAR1 будет осуществляться за счет CRISPR/Cas9 опосредованной гомологичной рекомбинации. Т.е. Для делеции генов необходимо с одной стороны, создать фрагменты ДНК, которые заменят эти гены, а с другой, создать векторы для продукции Cas9 и нацеливающих sgRNA в клетках дрожжей.

Последовательности для рекомбинации получали с помощью метода Overlap extension polymerase chain reaction. Для этого исходно получали ПЦР фрагменты PCR1 – PCR6. В качестве матрицы для получения фрагментов PCR1, PCR2, PCR4, PCR5 использовали геномную ДНК штамма I328. Амплификацию осуществляли с помощью Phusion полимеразы (Finnzymes, Финляндия) с использованием пар праймеров, представленных в таблице 7. Использовали следующий режим для амплификации на Mastercycler Eppendorf AG 22331:

Прогрев: 105°C

=====

1) Денатурация: 98 °C (00:30)

=====

2) Денатурация: 98 °C (00:10)

3) Отжиг: 53 °C (00:15)

4) Элонгация: 72 °C (00:20) (PCR1, PCR2, PCR4, PCR5)

4\*) Элонгация: 72 °C (00:30) (PCR3, PCR6)

===30x===

5) Финальная элонгация: 72 °C (10:00)

6) 20 °C

Полученные в результате ПЦР фрагменты выделяли из геля после электрофореза в агарозном геле с помощью набора Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, США).

В качестве матрицы для получения фрагментов PCR 3 и PCR 6 использовали смесь фрагментов PCR1 / PCR2 и PCR4 / PCR5, соответственно. Полученные в результате амплификации ПЦР-фрагменты PCR 3 и PCR 6 также выделяли из геля, рисунок 9.

Таблица 7 – фрагменты ДНК и праймеры для получения конструкций делеционных мутантов

ПЦР-фрагмент	Пара праймеров	Длина фрагмента
PCR1	Can_1F / Can_2R	231 nt
PCR2	Can_3F / Can_4R	224 nt
PCR3	Can_1F / Can_4R	455 nt
PCR4	Car_1F / Car_2R1	220 nt
PCR5	Car_3F1 / Car_4R	392 nt
PCR6	Car_1F / Car_4R	612 nt

#### CAN1

Can\_1F GCCACAGATCTGTATTCATGCTA

Can\_2R ctccgtctCCACACAGAAACCCTAGATTTCTAT

Can\_3F ctgtgtggAGACGGAGTAGAAGCATTTGAAA

Can\_4R TTGCGCTTACTACTTTTTGGCGT

## CAR1

Car\_1F AACCGTGTAGGCAAAACTGGAC

Car\_2R1 atgatgatAGACAGTATGCGTAGCTTTACCA

Car\_3F1 tactgtctATCATCATCCCTTTTATCAAAATAAGCA

Car\_4R AGATGGCCGATTTGAGAGCCT

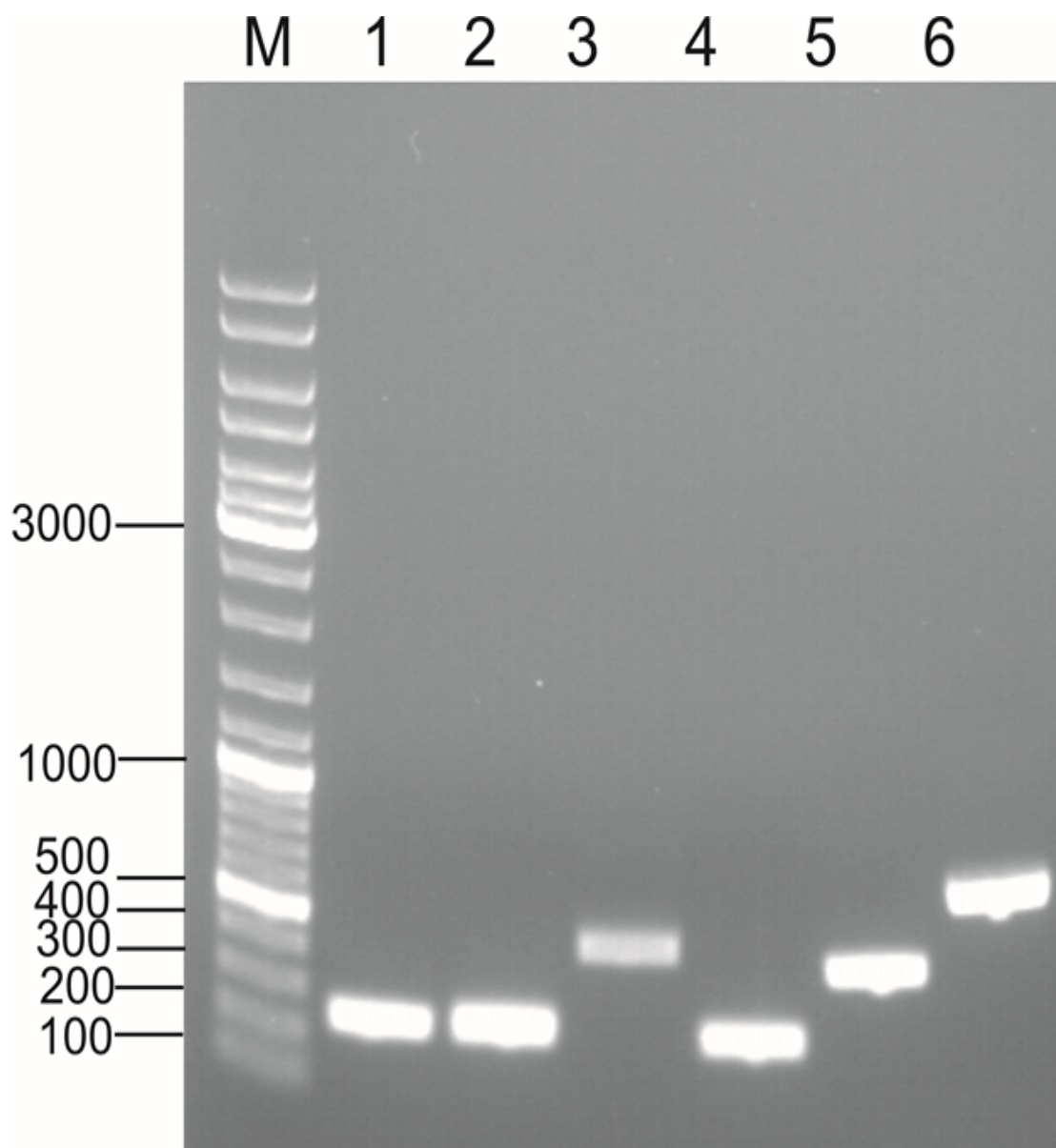


Рисунок 9 - Полученные ПЦР фрагменты. Электрофорез в 0,7% агарозном геле в бромистым этидием. М, ДНК-маркер (nt); 1 – 6, фрагменты PCR1 – PCR6

В результате были получены следующие фрагменты ДНК, которые будут использоваться



для замены генов CAN1 и CAR1 в геноме штамма дрожжей I328.

#### Замена гена CAN1

GCCACAGATCTGTATTCATGCTACTTCTGCAATATCAATCACTTACTGGCAAGTGCGTATA  
AATTA AACSTATTTCTTTATCATCATATTTACTTTATATCTTTAACAGATTCCAAACCSTAAA  
GTGTCCGAATTTTCAATAGGGCGAACTTGAAGAATAACCAAGGTCAATAATATATCTTTTA  
GTATAACCCTGAAATTTGCCCTATAGAAATCTAGGGTTTCTGTGTGGAGACGGAGTAGAA  
GCATTTGAAACTCCTTCAGACCTTCAAGTATATATATATATATATATATATATATGTATATGTGTA  
CATTTTCACGCTAATACTAATGTATAATTAGAAGATAATTTTTACTCATTTTTTCGTTATCTT  
CACGTCACCCGAACCTAGAACCAAATGTCATTTTCACGATATGTAAATAGTGAAATAGGC  
AAAAACGCCAAAAAGTAGTAAGCGCAA

#### Замена гена CAR1

AACCGTGTAGGCCAAAACCTGGACCGCCCGTTAAGTTCTGCTATTAACAAATTAATAAAAT  
TGGCCAAACTGATGATTGACAGTTCTGAATATCCAAGATTAAGTACTGACTTCAATTTTCTCACT  
TCTCATCATAAATATCCGCTGATTTTTACATACCGTATATCCAATTTACGGCCCTTCACATA  
TAGCGGCGAAATGATGGTAAAGCTACGCATACTGTCTATCATCATCCSTTTTATCAAAATA  
AGCATTCTCTTTTTATTTTAGTTAAGCACATGCATACATAAATTTACGAACAAAAAAGAA  
AATAAATTAATAAATAAAAGTAGTGTATCTTCGTTACTTTTCATTCTTTTTGGTTAACCCACG  
TCTAATTGCCAATACACTATCGACGATCACGGCATCTACACCTGCTTCAATTTGTATACTG  
GCATTTTCGGGATCATTGTTGTCCACACCGTAAGTGACACATACCAGCCCATTAGACTTAA  
CCTTGCACCAACCGTGGGGCCTTTAAAATGGGTGCTGCAGCAGATACAATCCCCAATA  
AATCCACTTCTTAGCAAATCTTATACCGTTTTGTAACGATGAGGCTCTCAAATCGGCCAT  
CT

Для получения конструкции, которая будет производить разрез в ДНК соответствующих генов, была модифицирована имевшаяся в распоряжении коллектива система, состоящая из 2х плазмид - одна, кодирующая нуклеазу Cas9, а также несущая в своем составе ген устойчивости к генетицину, что позволяет плазмиде поддерживаться в клетках.

Вторая плазмида содержала ген, кодирующий нацеливающую РНК (sgRNA), обуславливающую специфичность разрезания геномной ДНК. Важно отметить, что этот ген кодирует непосредственную sgRNA, слитую с тРНК (под контролем собственного промотора), а также рибозимом вируса гепатита дельта, который осуществляет отрезание тРНК от sgRNA после готовности полноразмерного транскрипта, рисунок 10. По описанным данным это существенно улучшает эффективность инактивации целевых генов [87]. Для получения плазмиды, которая бы кодировала gRNA специфичные к целевым генам, были использованы олигонуклеотиды, указанные в таблице 8:

Таблица 8 – Олигонуклеотиды, обеспечивающие разрезание целевых генов нуклеазой Cas9

Название	Последовательность (5'-3')
Cr-Can1nD Cr-Can1nR	GACTAAAAGAAGACGCCGACATAG AAACSTATGTCGGCGTCTTCTTTT
Cr-Can1mD Cr-Can1mR	GACTGTGGGCGCTCTTATATCATA AAACTATGATATAAGAGCGCCCAC
Cr-Car1nD Cr-Car1nR	GACTACTACTATCAAGATGGAAAC AAACGTTTCCATCTTGATAGTAGT
Cr-Car1mD Cr-Car1mR	GACTGGGTTGAGAGATGTTGATGC AAACGCATCAACATCTCTCAACCC

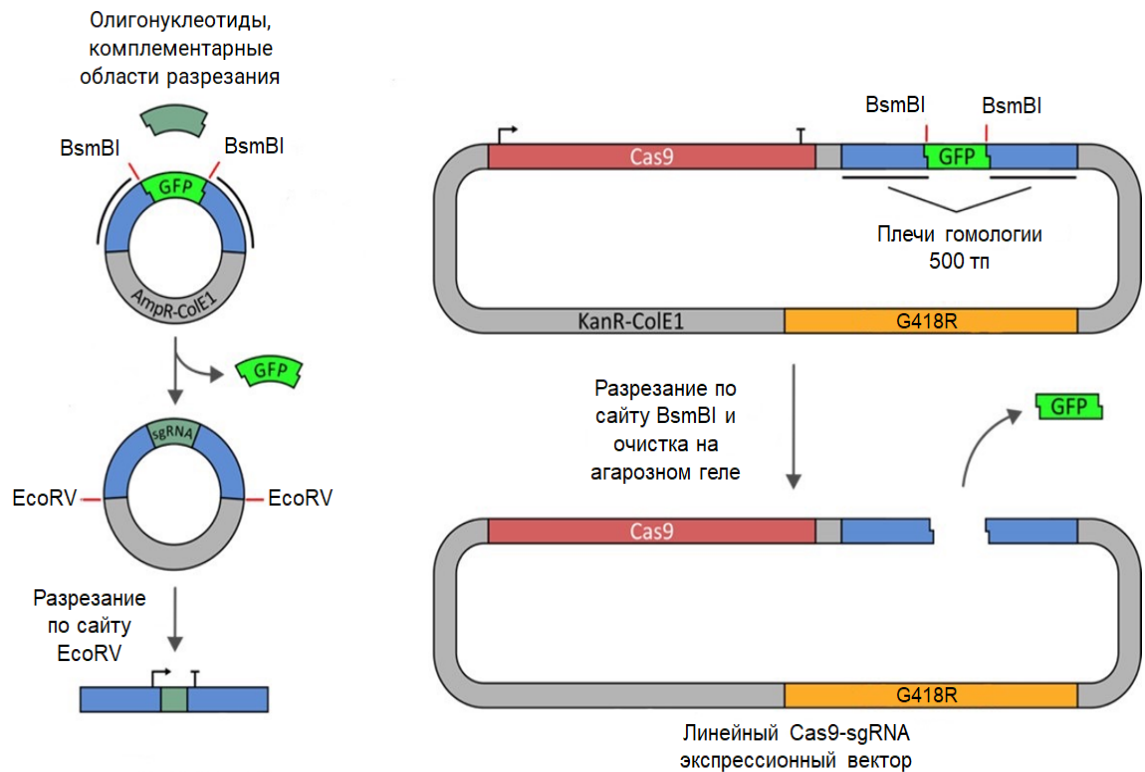


Рисунок 10 - Схема создания плазмид для CRISPR/Cas9 опосредованного разрезания целевого гена

Две эти плазмиды устроены так, что после линейаризации рестриктазами EcoRV (плазмида кодирующая sgRNA) и BsmBI (плазмида кодирующая Cas9), они способны рекомбинировать между собой, создавая единый вектор для продукции Cas9 и sgRNA. Это происходит *in vivo* в клетках дрожжей, таким образом создавая селекцию для эффективной гомологичной рекомбинации и таким образом увеличивает эффективность процедуры, рисунок 11 [32].

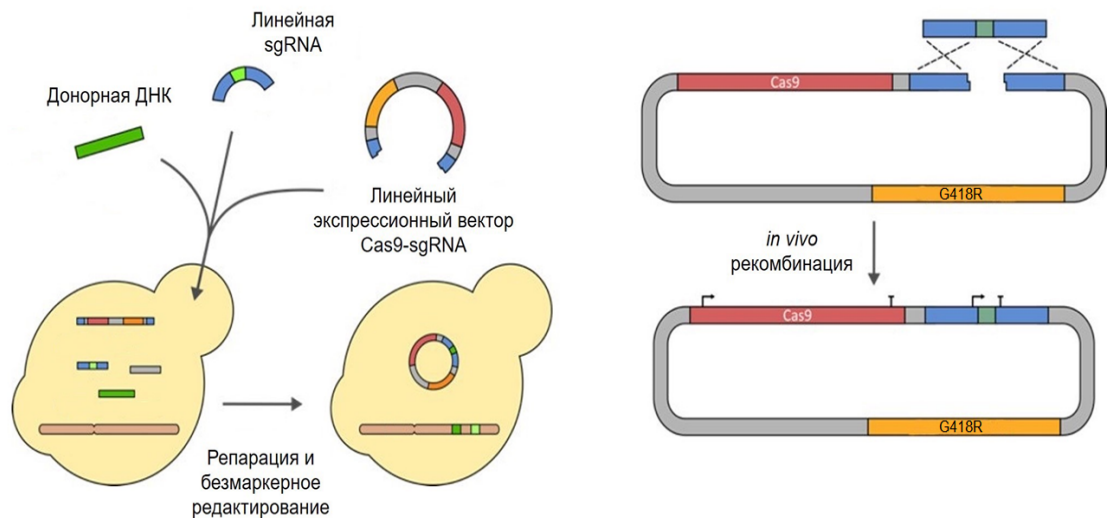


Рисунок 11 - Схема рекомбинации целевой плазмиды *in vivo* в клетках дрожжей

Для того, чтобы произвести полную делецию целевых генов, в штамм одновременно вводится последовательность, кодирующая фрагмент ДНК, содержащий фланги целевого гена (см. выше). Т.е. при интеграции такого фрагмента в место разреза, проведенного Cas9, происходит замена сайта узнавания.

Таким образом, в ходе данного этапа проекта были созданы конструкции, кодирующие нацеливающие sgRNA для генов *CAN1* и *CAR1* целевого штамма дрожжей I-328, а также фрагменты ДНК для репарации разрезанных областей генома, который позволят произвести полную делецию этих генов.

#### 1.2.4 Создание генетической конструкции для экспрессии генов малат-пермеазы и малолактоического фермента в дрожжах

Подавляющее большинство красных вин, а также некоторые белые и игристые вина получают путем двух последовательных стадий брожения – винного брожения, осуществляемого дрожжами, и яблочно-молочного брожения (превращения яблочной кислоты в молочную с выделением углекислоты и воды). Включение стадии ЯМБ в технологический цикл снижает кислотность вина и улучшает его букет и микробиологическую стабильность. Обычно ЯМБ осуществляется молочнокислыми бактериями винного сула, например, *Oeopococcus oeni*. Однако эти бактерии чувствительны к ингибирующим условиям винного брожения. Поэтому

штамм винных дрожжей, способный осуществлять одновременно и ЯМБ, представлял бы большой интерес для виноделов.

Ранее уже был получен штамм ML01 [64], способный одновременно с винным брожением осуществлять яблочно-молочное брожение (ЯМБ), т.е. превращать яблочную кислоту в молочную с выделением углекислоты и воды. Штамм ML01 полученный на основе винного штамма S92 содержит ген малат пермеазы *mae1 S.pombe* и ген малолактического фермента *O.oeni mleA* под контролем сильного конститутивного промотора гена PGK1 *S.cerevisiae*. Штамм способен полностью сбродить яблочную кислоту в концентрации 5г/л в составе сусле за 5 дней, не оказывая при этом негативного воздействия на сенсорные качества вина. Дальнейший фенотипический, транскриптомный, протеомный анализ показал, что штамм ML01 эквивалентен исходному родительскому винному штамму [64].

В данной работе для создания винных штаммов, способных к ЯМБ, будут использованы приемы метаболической инженерии, основанные на интеграции в геном винного штамма (I-328) кассет экспрессии генов малат-пермеазы и малолактического фермента (malolactic enzyme), под контролем регуляторных последовательностей генов, индуцируемых на стадии брожения.

В качестве источника гена малолактического фермента были использованы молочнокислые бактерии *Oeopococcus oeni* из коллекции микроорганизмов «Магарач» выделенный из отечественных виноматериалов. В таблицах 9-10 представлены характеристики штамма K.19 *O. oeni*.

Таблица 9 - Характеристика природных штаммов МКБ

№ штамма	Вид	Морфологическая характеристика	Происхождение	Источник выделения	Образование газа из глюкозы
K.19	<i>O. oeni</i>	Мелкие кокки сферической формы, размер 0,5 мкм, образуют в основном в пары, встречаются цепочки по 4–8 клеток	микровиноделие ПОХ «Магарач», 2017 г.	игристые необработанные виноматериалы	+

Таблица 10 - Декарбоксилирующая способность штаммов МКБ

Штамм	Вид	рН среды 4,0		рН среды 3,2	
		Δ титруемой кислотности, мг/л	Потребление L-яблочной кислоты, %	Δ титруемой кислотности, мг/л	Потребление L-яблочной кислоты, %
К. 19	<i>O. oeni</i>	0,73	91,0	0,44	51,8

Для определения последовательности гена малолактического фермента (*mleA*) штамма *O. oeni* К.19, был расшифрован полный геном этого штамма. Для расшифровки генома на первом этапе из культуры клеток был выделен препарат геномной ДНК с использованием набора DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN, Германия) по протоколу, рекомендованному фирмой производителем. Количество выделенной ДНК определяли флуориметрическим методом с использованием наборов Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific) по протоколам фирмы производителя. В результате было выделено более 9.8 мкг геномной ДНК со средним размером более 10000 нуклеотидов.

Для определение геномной последовательности штамма *O. oeni* К.19 использовали платформу Illumina (MiSeq). На следующем этапе была приготовлена геномная библиотека «случайных фрагментов» пригодная для секвенирование на приборе MiSeq (Illumina) с помощью набора NEBNext ultra II DNA Library kit (NEB) и затем прочитана на геномном анализаторе MiSeq в формате 2\*300 нт.

С помощью программы flash (Magoc и Salzberg 2011) объединялись полученные на MiSeq (Illumina) парные пересекающиеся чтения и с помощью программы Sickle обрезались некачественные концы чтений. Сборку полученных последовательностей осуществляли с помощью программы Spades. Для идентификацию структурных (белок-кодирующих) генов и генов рибосомных РНК, и предсказание их функций проводили с использованием сервера RAST [100].

Результаты сборки и аннотации представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты сборки генома штамма *O.oeni* K.19

	<i>O.oeni</i> K.19
Объем секвенирования (нт)	377749582
Число чтений	1254982
Средняя длина чтения (нт)	301
Суммарная длина контигов (нт)	1851384
Количество контигов	34
N50 контигов (нт)	173149
Белок-кодирующие гены	1989

В результате анализа его генома был обнаружен ген, кодирующий малолактический фермент *mleA* этот ген использовали для дальнейших генно-инженерных работ:

>mleA *O.oeni* K19

atgacagatccagtaagtatttaaatgatccttttattaacaaaggaactgcttttacggaagcggagagagaggagcttggtttaaaccggttattaccggccaaggttcaggccttacaagagcaagttgatcagacttatgctcaattcaagcaaggttcaaatctgaaaaacgattgttttaattggaatattcaatacgaatcacgtgtgtttataagctttttctcaacatggtgtgaatttatgccaattgtttatgacccgacaattgctgatacaattgaaaatatttcggaattattgtgaaccgcaaggtgccgctttttggatattaatcatccgaaaacattcaatcgactctgaaaaatgctgctaattggccgcgatatcaagctgctggctgtttctgatgccgaaggtattctgggattggagactggggtgtccagggtgtgatattgctgtcggcaaacgatggtttatacagttgcggccggaatcgcattcaacagttcttgcagttgttattgatgctggaacaaataacgaaaagctttgaaagatcctatgtattgggaaataaatttaactggttcggtgcgataagactatgatttatcgacaaattgttaacatgccgaatcgcttttctcaatttatatttgattgggaagattttggccgttcgaatgcttctaataatcttaaacagctataaagataaaattgctacttttaattgatgatattcaaggaactggaatcgctgttcttggccggcgttctggagcgttgaagatttcggtcagaaattaactgatcaaacctacatgagcttcgggtgccggaactgctggaatgggaattgtaaacagttgcatgaagaaatgggtgaacagggctttccgacgaagaggctaaaaagcatttcttctgttgacaacaaggcctctgtttgacgatgatccggatttaactccagagcaaaagccttcgctgctaacgaagtattcaaaaatgctaataattgaccaatctcaagcagctgttgaagctgccaccgaccattttggtc

ggaacctcgacacatccaaattcctttactgaagaaattgtaaagatatgtctggtataactgaaagaccaatcattttccaattccaatccaacaaaatt  
agccgaagcaaaaagccgaagatgtttgaaatggtctaattgaaaagccttgatcggtactggtgtccagttgacgatattgaatatgagggcaacgc  
ttaccaaactcggtcaggccaacaatgccttgatctatccaggtcttggtcttggtgccattgccgctcaatcaaagctgcttacgcctgaaatgattctgc  
tgtgcccatagtcttgagggaatcgttgatacaacaaaagttggtgctgctgtttgccaccagttcaaaattagccgactttcgcgtacagtcgctgt  
cgctgctgctaaaaaagctgttgaacaaggcttaatcgcagccgattgatgatgttgaagggcctgacgattgaagtgaggagccgaaataact  
aa

Ген малат-пермеазы (*maeI*) был взят из дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* выделенный из отечественных сортов виноматериала.

>*maeI S.pombe*

ATGGGTGAACTCAAGGAAATCTTGAAACAGAGGTATCATGAGTTGCTTGACTGGAATGTC  
AAAGCCCCTCATGTCCCTCTCAGTCAACGACTGAAGCATTTTACATGGTCTTGGTTTGCA  
TGTA CTATGGCAACTGGTGGTGTGGTTTGATTATTGGTTCTTTCCCCTTTCGATTTTAT  
GGTCTTAATACAATTGGCAAAAATTGTTTATATTCTTCAAATCTTTTTGTTTTCTCTCTTT  
GGATCATGCATGCTTTTTTCGCTTTATTAATATCCTTCAACTATCAAGGATTCCTGGAAC  
CATCATTTGGAAAAGCTTTTCATTGCTACTTGTCTTCTTTCAATATCCACGTTTCATCGAC  
ATGCTTGCCATATACGCCTATCCTGATACCGGCGAGTGGATGGTGTGGGTCATTTCGAATC  
CTTTATTACATTTACGTTGCAGTATCCTTTATATACTGCGTAATGGCTTTTTTTTACAATT  
TTCAACAACCATGTATATAACCATGAAACCGCATCTCCTGCTTGGATTCTTCCTATTTTC  
CCTCCTATGATTTGTGGTGTCAATTGCTGGCGCCGTCAATTCTACACAACCCGCTCATCAA  
TTAAAAAATATGGTTATCTTTGGTATCCTCTTTCAAGGACTTGGTTTTTTGGGTTTATCTT  
TACTGTTTGCCGTCAATGTCTTACGGTTTTTTTACTGTAGGCCTGGCAAAAACCCCAAGAT  
CGACCTGGTATGTTTATGTTTGTTCGGTCCACCAGCTTTCTCAGGTTTGGCCTTAATTAAT



ATTGCGCGTGGTGCTATGGGCAGTCGCCCTTATATTTTTGTTGGCGCCAACATCCGAG  
TATCTTGGTTTTGTTTCTACCTTTATGGCTATTTTTATTTGGGGTCTTGCTGCTTGGTGT  
TACTGTCTCGCCATGGTTAGCTTTTTAGCGGGCTTTTTCACTCGAGCCCCTCTCAAGTTT  
GCTTGTGGATGGTTTGCATTCATTTTCCCAACGTGGGTTTTGTTAATTGTACCATTGAG  
ATAGGTAAAATGATAGATTCCAAAGCTTTCCAAATGTTTGGACATATCATTGGGGTCATT  
CTTTGTATTCAGTGGATCCTCCTAATGTATTTAATGGTCCGTGCGTTTCTCGTCAATGAT  
CTTTGCTATCCTGGCAAAGACGAAGATGCCCATCCTCCACCAAACCAAATACAGGTGTC  
CTTAACCCTACCTTCCCACCTGAAAAAGCACCTGCATCTTTGGAAAAAGTCGATACACAT  
GTCACATCTACTGGTGGTGAATCGGATCCTCCTAGTAGTGAACATGAAAGCGTTTAA

Основываясь на данных транскриптомного анализа штамма дрожжей I329 на разных стадиях, были выбраны два промотора.

Таблица 12 - Данные транскриптомного анализа для штамма дрожжей I329 для генов с уровнем транскрипции более 100 000 отн. ед. на стадии брожения

Продукт	уровень транскрипции, отн. ед.
18S ribosomal RNA	494835
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) TDH1	360738
hexose transporter HXT3	343160
phosphopyruvate hydratase ENO1	329876
Ccw12p	311551
indolepyruvate decarboxylase 1	265777
translation elongation factor EF-1 alpha	261295
fructose-bisphosphate aldolase FBA1	240465
Sed1p	221634
stearoyl-CoA 9-desaturase	217976
Hsp70 family ATPase SSA1	216418
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) TDH3	190522
GPI-anchored mannoprotein	186486
pyruvate kinase CDC19	181782

Продолжение таблицы 12

phosphoglycerate mutase GPM1	162485
Ygp1p	158260
triose-phosphate isomerase TPI1	145092
alcohol dehydrogenase ADH1	145031
phosphoglycerate kinase PGK	138571
phosphopyruvate hydratase ENO2	127502
thioredoxin peroxidase TSA1	120881
Cwp2p	120320
H(+)-exporting P2-type ATPase PMA1	116508
Hsp70 family chaperone SSA2	112162
thiamine thiazole synthase	109658
Spi1p	104972

Промоторы генов ферментов гликолиза фосфоглицерат киназы (PGK) и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (TDH1) являются активными, и они были выбраны в качестве промоторов генов *mae1* и *mleA*.

Так ген *mae1* был клонирован под контролем промотора гена TDH1 с сохранением контекста стартового кодона. Последовательность терминатора соответствовала собственному терминатору гена *mae1*. Ген *mleA* был клонирован под контроль промотора гена PGK1 с сохранением контекста стартового кодона, использовался терминатор гена PGK1. Клонирование двух кассет экспрессии осуществлялась в вектор pJJ244. Данный вектор содержит кассету для гена URA3, которая вместе с полученными кассетами будет переноситься в геном штамма дрожжей I328.

Схема конструкции представлена на рисунке 12.

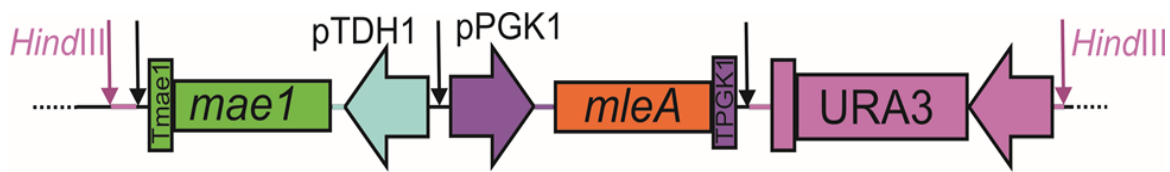


Рисунок 12 - Схема конструкции. Показана область, которая будет интегрирована в геном дрожжей I328. URA3, кассета экспрессии гена биосинтеза урацила; *mae1*, ген малат-пермеазы *S.pombe*; Tmae1, терминатор гена малат-пермеазы *S.pombe*; pTDH1, промотер гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы штамма дрожжей I328; pPGK1 и TPGK1, промотера и терминатор гена фосфоглицерат киназы (PGK1) штамма I328. Стрелками показаны сайты рестрикции

#### **Схема получения конструкции для ЯМБ**

Клонирование кассет экспрессии для генов *mae1* и *mle1* осуществляли в плазмиду pJJ244\_Ura3, схема которой представлена на рисунке 13.

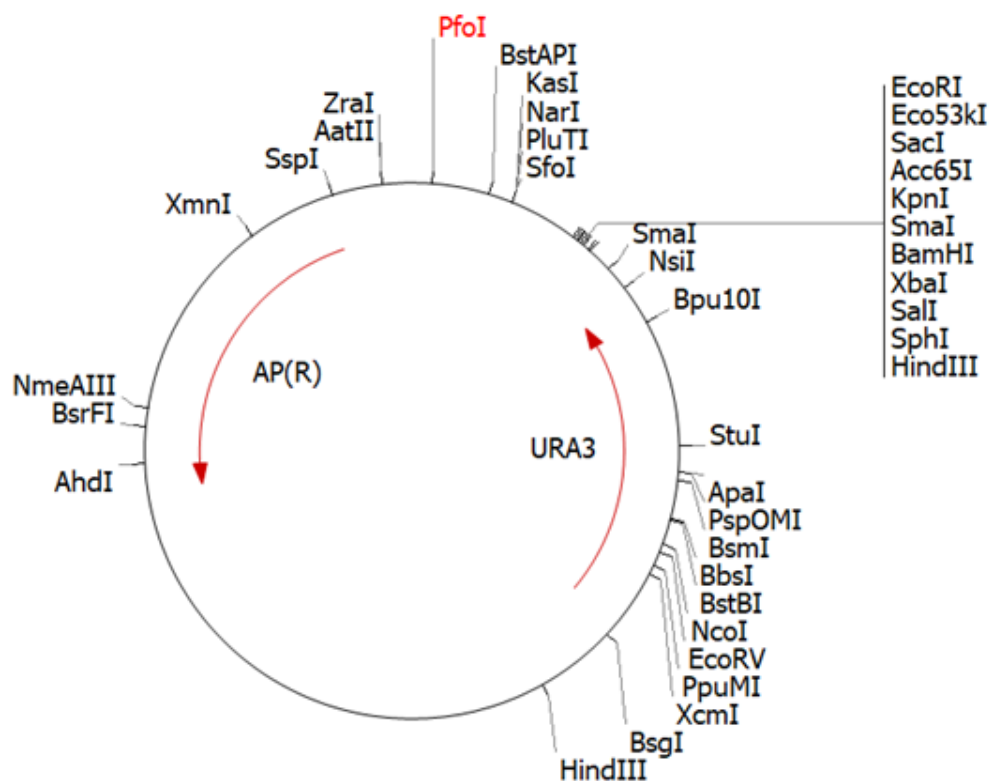


Рисунок 13 - Схема плазмиды pJJ244\_Ura3

На первом этапе удаляли сайт рестрикции *SmaI*, расположенный в полилинкере. Для этого препарат плазмидной ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *XbaI*, полученный фрагмент ДНК обрабатывали фрагментом Кленова, затем лигировали вектор сам на себя. Также в процессе модификации был удален полилинкер, что позволяет вводить уникальные сайты рестрикции в вектор. Схема полученной конструкции представлена на рисунке 14.

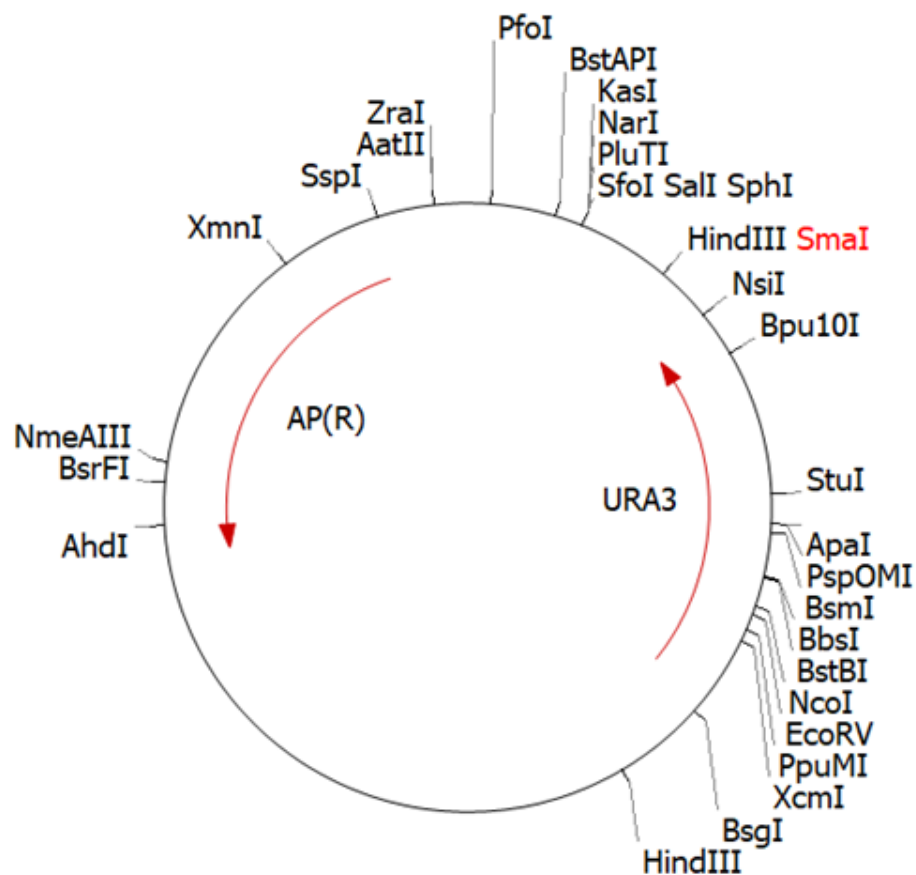


Рисунок 14 - Схема плазмиды pJJ244\_Ura3\_del

На следующем этапе клонирование осуществляли в уникальный сайт *SmaI*. Дополнительно к данному сайту клонировали два сайта рестрикции *XhoI* и *ClaI*.

Для этого *SmaI-StuI* фрагмент вектора заменяли на ПЦР-фрагмент, полученный с использованием данного вектора в качестве матрицы, в праймер к *SmaI* сайту были добавлены *XhoI* и *ClaI* сайты для эндонуклеаз рестрикции.

Схема дальнейшего клонирования представлена далее на рисунке 15.

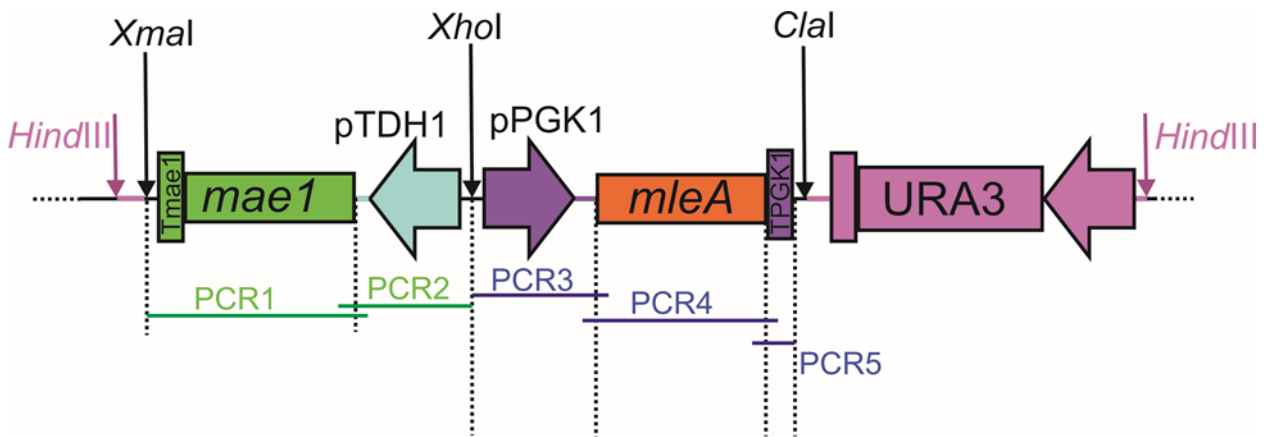


Рисунок 15 - Схема клонирования

Последовательности для клонирования получали с помощью метода Overlap extension polymerase chain reaction. Для этого исходно получали ПЦР фрагменты PCR1 – PCR5, как описано ранее. Объединяли фрагменты PCR1 – PCR2 (кассета 1) и PCR3 – PCR4 – PCR5 (кассета 2). Клонирование кассет осуществляли по отдельности и вместе. Было получено три вектора, рисунок 16.

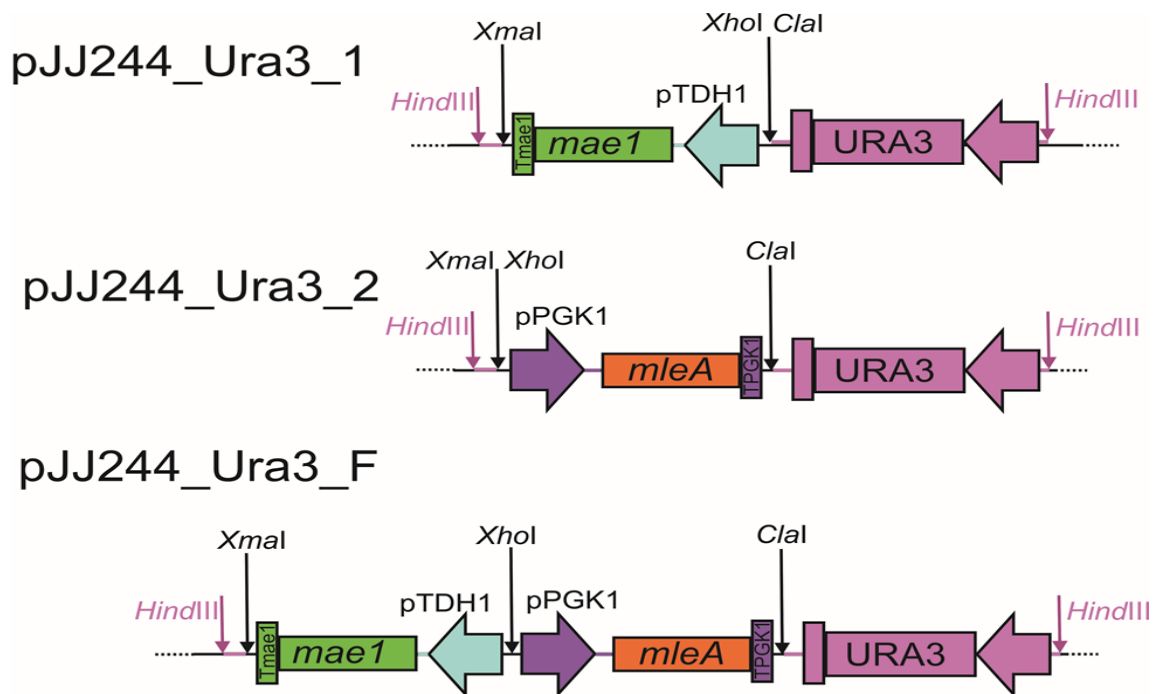


Рисунок 16 - Схема полученных векторов

Таким образом, была получена генетическая конструкция для экспрессии генов малат-пермеазы и малолактического фермента. На следующем этапе данная конструкция будет интегрироваться в геном дрожжей штамма I328, в которых предварительно будет удален ген URA3 посредством его замены на флуоресцентный белок. Это позволит далее проконтролировать введение блока ЯМБ во все три копии генома триплоидного штамма.

Кроме работы по созданию генетических конструкций для генной модификации винных дрожжей, также была проведена аналитическая работа по анализу факторов, имеющих отношение к виноделию, которые могут вызывать гибель дрожжей, а также тех особенностей гибели клеток, которые наблюдаются при воздействии таких факторов. В число таких факторов вошло воздействие различных спиртов, органических кислот, а также взаимодействия между разными видами дрожжей. Результаты рассмотрения этих работ (62 статьи) вошли в состав обзорной статьи, опубликованной в Journal of Fungi.

1.2.5 Создание генетических конструкций, обеспечивающих направленную интеграцию «кассет экспрессии» целевых генов в наиболее предпочтительные локусы хромосом *P. pastoris*, обеспечивающих получение рекомбинантных продуцентов, свободных от генов антибиотикорезистентности, мобильных элементов и бактериальных плазмидных репликонов

Использование различных локусов для вставки экспрессионных кассет дает возможность получать разный уровень экспрессии. Ниже на рисунках 17 и 18 приведены карты двух генетических конструкций, позволяющих осуществлять вставку кодирующей области методом гомологичной рекомбинации по локусу TRP2. Отбор клонов осуществляется за счет селекции на средах дефицитных по аденину и лейцину соответственно. В качестве альтернативных локусов для вставки предполагается использовать ENO1, RGI2, NTS, показавших свою эффективность на ранее созданных конструкциях [46]. Помимо локус-специфичной интеграции, стоит отметить появление элементов, позволяющих создавать стабильные конструкции для автономной репликации эписомной ДНК [5].



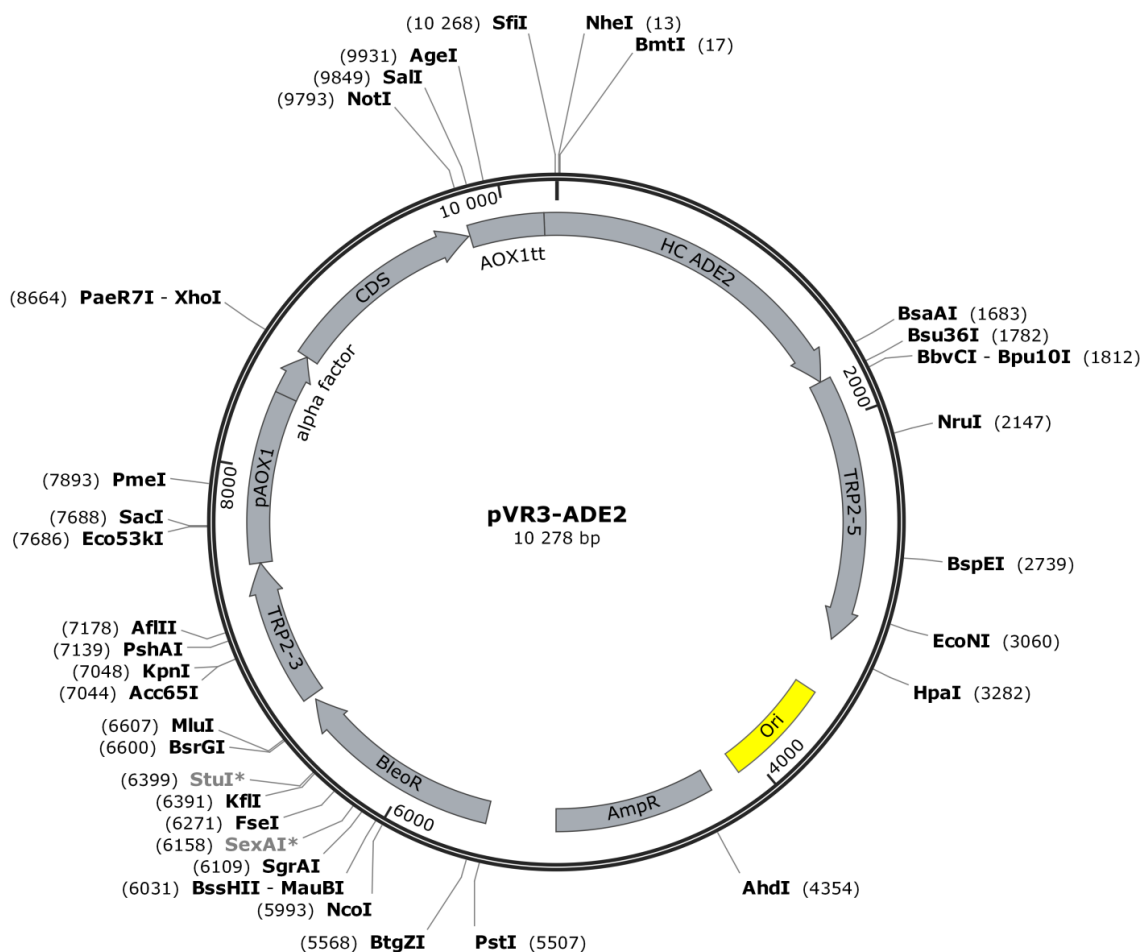


Рисунок 17 - Сборный вектор pVR3-Ade2 для экспрессии рекомбинантных белков под метанол-индуцируемым промотором pAOX1 в локус TRP2, данный вектор общей длиной 10278 п.о. состоит из следующих элементов:

- а) HC ADE2 – ген ADE2 с укороченным промотором для многокopiesной вставки;
- б) TRP2-5 – 5'-фрагмент локуса TRP2;
- в) Ori - бактериальная точка начала репликации;
- г) Amp – ген резистентности к ампицилину;
- д) BleoR – ген резистентности к антибиотику зеоцину;
- е) TRP2-3 – 3'-фрагмент локуса TRP2;
- ж) pAOX1 – AOX1-промотор;
- з) a-factor – альфа-фактор для внеклеточной секреции;
- и) AOX1tt – терминатор транскрипции AOX1tt.

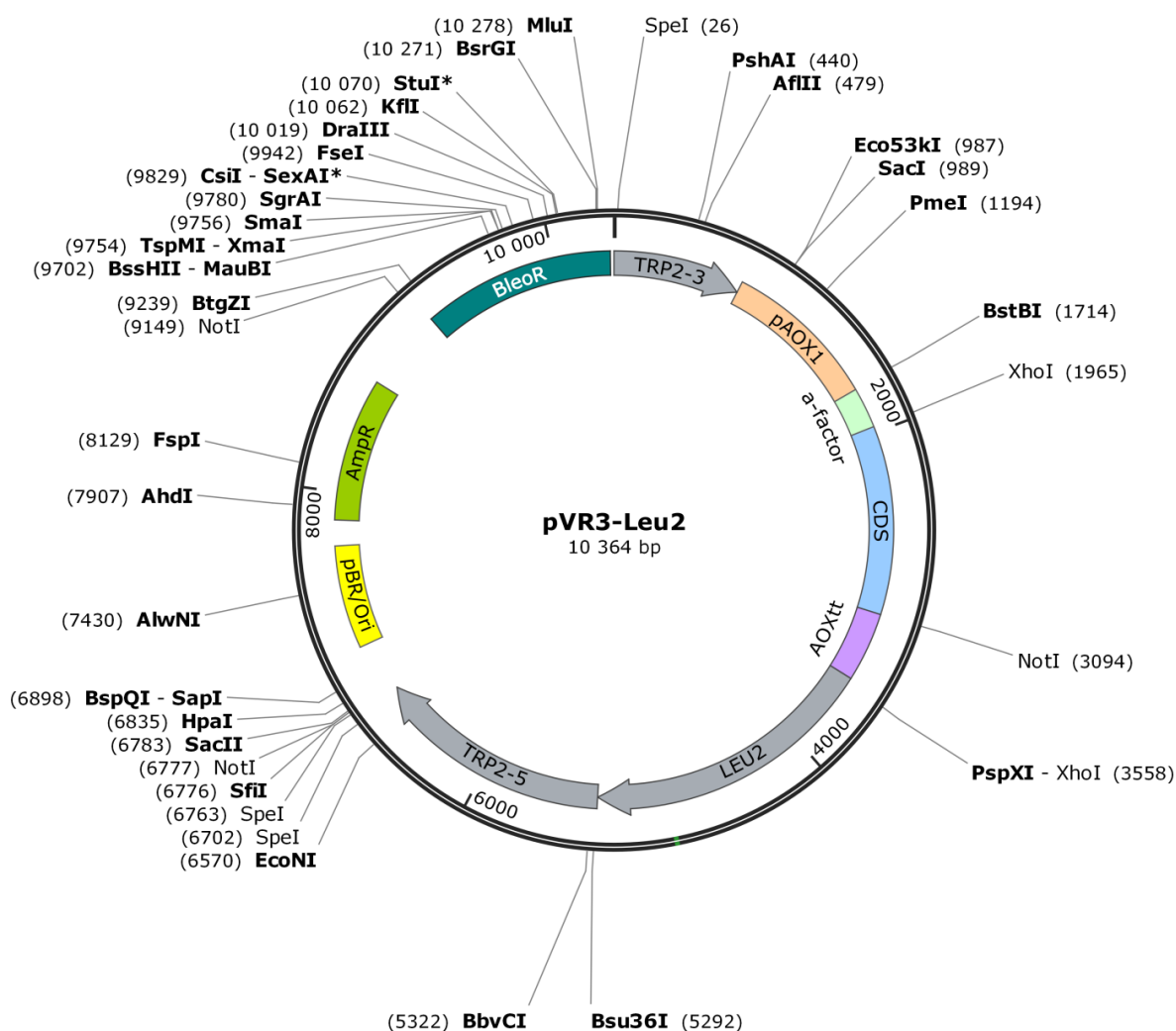


Рисунок 18 - Сборный вектор pVR3-Leu2 для экспрессии рекомбинантных белков под метанол-индуцируемым промотором pAOX1 в локус TRP2, данный вектор общей длиной 10364 п.о. состоит из следующих элементов:

- а) TRP2-3 – 3'-фрагмент локуса TRP2;
- б) pAOX1 – AOX1-промотор;
- в) a-factor – альфа-фактор для внеклеточной секреции;
- г) AOX1tt – терминатор транскрипции AOX1tt;
- д) HC LEU2 – ген LEU2 с укороченным промотором для многокопийной вставки;
- е) TRP2-5 – 5'-фрагмент локуса TRP2;
- ж) Ori - бактериальная точка начала репликации;
- з) Amp – ген резистентности к ампицилину;

и) *BleoR* – ген резистентности к антибиотику зооцину.

#### 1.2.6 Получение рекомбинантных штаммов *Penicillium verruculosum* – продуцентов «бинарных» комплексов эндоглюканазы/фитазы и ксиланазы/фитазы

В современном мире основной задачей сельскохозяйственных предприятий становится увеличение экономической эффективности производства, повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы и снижение ее себестоимости. Успехи, достигнутые в области изучения роли микрофлоры кишечника в гидролизе сложных органических соединений кормов и всасывания их метаболитов через слизистую оболочку кишечника, в формировании и развитии ферментативного звена пищеварительной системы, явились предпосылкой разработки и использования ферментных препаратов. Проблема обеспечения промышленного птицеводства и животноводства высококачественными и, в то же время, недорогими кормами остается актуальной.

Моногастричные животные, в силу особенностей пищеварения, отличающиеся от жвачных, практически не могут разрушать межклеточные стенки зерновых компонентов, содержащие в своем составе различные некрахмальные полисахариды (НПС), в связи с этим особую актуальность приобретают использование комплексных ферментных добавок в рационах этих видов животных.

Попадая в пищеварительный тракт моногастричных животных (поросят и птицы), НПС затрудняют переваривание и всасывание питательных веществ. В итоге образуется застой желеобразной кормовой массы, которая служит субстратом для развития условно-патогенной микрофлоры.

К НПС относится широкий круг веществ: пентозаны, пектиновые вещества, арабиноксиланы,  $\beta$ -глюканы, пектины, маннаны, галактоолигосахариды. Их соотношение и содержание различно в зависимости от вида корма. Арабиноксиланы в большом количестве находятся в пшенице, рапсе, ячмене, кукурузе (около 7%),  $\beta$ -глюканы — в ячмене и овсе (около 4%). Много пектинов содержится в подсолнечнике, рапсе, горохе и сое (около 6%), галактоолигосахаридов — в сое (4%), а также рапсе (3%). Большое количество НПС также содержит рожь. В отдельных растительных продуктах переработки (например, отрубях) содержание НПС может превышать 20%, а в злаковых их содержание колеблется от 5 до 13%.

Следует отметить, что в зерновых и бобовых растениях около 60-80% общего фосфора находится в форме фитатов. Фосфор – один из основных минеральных элементов в питании прокариот и эукариот, составляет основу нуклеиновых кислот, фосфолипидов, молекул-энергоносителей. Однако большая часть почвенного фосфора представлена фитатом – недоступной для питания высших эукариот формой фосфорорганических соединений.

Таким образом, основным способом уменьшения негативного влияния НПС и фитатов кормов является использование экзогенных ферментов, которые будучи включёнными в состав корма дополняют ферментную систему моногастричных, обеспечивают переваривание и в результате способствуют улучшению использования питательных веществ рациона, а также улучшают здоровье сельскохозяйственных животных и птицы.

Фитаза переводит связанный, неусвояемый фосфор зерна в доступную для усвоения форму, увеличивает доступность энергии, протеина, макро- и микроэлементов из зерновых, жмыхов и шротов. Фитаза не вырабатывается животными организмами, а в растениях ее содержится мало, поэтому фосфор практически не доступен птице и другим животным [112; 116].

Для кормовой отрасли наиболее востребованы ферменты, действующие при низких значениях pH. К ним относятся фитазы, синтезируемые представителями грибов рода *Aspergillus*, которые являются промышленными продуцентами многочисленного ряда пищевых микроингредиентов. Фитаза *A. niger* является высокоактивным ферментом, способным осуществлять деструкцию фитата до мио-инозит-2-монофосфата и устойчивым к протеолитической деградации пепсином [11; 16; 103].

Целлюлазы и  $\beta$ -глюканазы способны «разрыхлять» клетчатку за счет расщепления  $\beta$ -глюкана, что способствует сорбции токсинов и увеличению переваримости целлюлозы, а также стимулированию роста собственной полезной микрофлоры в кишечнике.

В состав ферментного комплекса *P. verruculosum* входит высокоэффективная эндо-1,4- $\beta$ -глюканаза II, относящаяся к 5-ой семье гликозид-гидролаз. Эндо-1,4- $\beta$ -глюканаза II имеет высокую молекулярную активность по отношению к  $\beta$ -глюкану и обладает устойчивостью к воздействию высоких [36; 113; 115] температур.

Таким образом, наличие в составе ФП высокоактивной эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы II позволит значительно уменьшить степень полимеризации и вязкость НПС, что приведет к улучшению усвояемости животными питательных веществ кормов на основе ячменя, пшеницы и тритикале,

а совместно с фитазой А *A.niger* позволит эффективно использовать в рационе животных соевые и подсолнечные шроты, расширяя тем самым рационы животных высокобелковыми кормами.

Ксиланаза гидролизует ксиланы и арабиноксиланы до моно-, ди- и трисахаридов, а также олигосахаридов с более высокой степенью полимеризации. В результате применения препаратов на основе ксиланазы повышается скорость прохождения пищи в кишечнике, снижается вязкость химуса [66].

Известно, что эндо- $\beta$ -1,4-ксиланазы, катализирующие неупорядоченный гидролиз ксилозидных связей между остатками D-ксилозы в основной цепи ксиланов, широко применяются в кормовой промышленности для разрушения НПС злаковых культур, используемых в кормлении моногастричных животных и птицы.

Стоит, однако, отметить, что применяемые на практике ФП ксиланаз не обладают необходимыми свойствами: достаточной термостабильностью, высокой удельной активностью, а также устойчивостью по отношению к белковым ингибиторам злаков (последние оказывают негативное действие на ксиланазы при гидролизе ксиланов, содержащихся в зерне злаков [111].

Обнаружено, что эндо-1,4- $\beta$ -ксиланаза Е *P.canescens*, принадлежащая 10-й семье гликозид-гидролаз, является весьма перспективным ферментом для использования в качестве добавки к комбикормам на основе злаков, поскольку она устойчива к действию белковых ингибиторов, присутствующих в злаках, таких как рожь, пшеница, ячмень, а также обеспечивает глубокую степень гидролиза арабиноксилана [118].

В связи с этим, наличие в составе нового ФП термостабильной, неингибируемой ксиланазы, позволит значительно уменьшить вязкость НПС кормов за счёт гидролиза высоковязких растворимых в водной среде ксиланов и уменьшения их степени полимеризации, что приведет к улучшению усвояемости животными питательных веществ кормов на основе пшеницы и ржи, а совместно с фитазой А *A.niger* позволит эффективно использовать в рационе животных соевый шрот и подсолнечный жмых.

Таким образом, создание новых рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* с высоким уровнем экспрессии гетеролигичной фитазы А *A.niger*, гомологичной эндо- $\beta$ -1,4-глюканазы II и гетерологичной фитазы А *A.niger*, а также гетерологичных эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазы Е *P.canescens* и фитазы А *A.niger* увеличит выход целевых ферментов, способных значительно снизить вязкость НПС и увеличить усвояемость питательных веществ корма, снизив тем самым стоимость конечного продукта.

Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* обладает гидролитическим комплексом внеклеточных ферментов, способным к эффективной биоконверсии растительной биомассы, в том числе антипитательной составляющей кормов. В этот комплекс входят целлюбиогидролазы, эндоглюканазы и  $\beta$ -глюкозидаза. На основе реципиентного штамма *P.verruculosum* 537 ( $\Delta$ niaD) создана экспрессионная система [114], то позволяет использовать данный гриб как основу для получения рекомбинантных штаммов – продуцентов ферментов для практического применения в различных областях промышленности и сельского хозяйства [22; 47; 93].

#### 1.2.6.1 Разработка генетических конструкций для трансформации компетентных клеток

Аmplификация целевых генов проводилась методом ПЦР с использованием праймеров, таблица 13, написанных на основании нуклеотидных последовательностей генов *phyA* (GenBank AN: Z16414), *egl2* [114] и *xylE* (GenBank AN: FJ860894.1). Полинуклеотидные последовательности генов приведены на рисунке 19 (А-В). ПЦР проводилась с использованием полимеразы LPM и dNTP (ThermoFisher Scientific, США). В качестве матрицы были выделены геномные ДНК соответствующих штаммов (DNeasy Plant Mini KIT, QIAGEN, США). Условия ПЦР для амплификации гена *phyA* (1506 п.о.), кодирующего фитазу *A.niger*, были (95 °C – 5 мин, (95 °C – 1,5 мин, 50 °C – 1 мин, 68 °C – 90 сек) – 25 циклов, 68 °C – 10 мин, 4 °C -  $\infty$ ), ген *egl2* (1319 п.о.), кодирующий эндо- $\beta$ -1,4-глюканазу II *P.verruculosum* (95 °C – 5 мин, (95 °C – 1 мин, 50 °C – 1 мин, 68 °C – 80 сек) – 25 циклов, 68 °C – 10 мин, 4 °C -  $\infty$ ) и ген *xylE* (1148 п.о.), кодирующий эндо-1,4- $\beta$ -ксилазу E *P.canescens* (95 °C – 5 мин, (95 °C – 1 мин, 50 °C – 1 мин, 68 °C – 60 сек) – 25 циклов, 68 °C – 10 мин, 4 °C -  $\infty$ ).

Таблица 13 - Праймеры, использованные для амплификации целевых генов

Название	Последовательность 5`→3`
XYLE-LIC5	GGCAACAGCAGGAGCTCCTCACTTGCCCCGGCAACAAGGAC
XYLE-LIC3	AGAGGAGGGCGACACAGTCTAGCACACACTGCAAGGCTTCCCTC
PHYA-LIC5	CAAACAGAAGCAACCGACACAATGGGCGTCTCTGCTGTTCTACTTCC
PHYA-LIC3	GAGGAGAAGCCCGGTCTAAGCAAAACACTCCGCCCAATCA
EG-LIC5	GGCAACAGCAGGAGCTGCAAACCTCAAAGAAGTCAAGAAAC
EG-LIC3	AGAGGAGGGCGACACAGTTCAAAAATAAGTCTCCAAAATCGACA

## A

atggcgctctgctgttctactcctttgtatctctgtctgggtatgctaagcaccacaatcaaagtctaataaggacctcccttccgagggccctgaa  
gctcggactgtgtggactactgatcgtgactatctgtgcagagtcacctccggactggcagtcctccgcctcgagaaatcaatccagttgcgatacggcgcag  
gggtatcaatgcttctccgagacttcgcatcttgggggtaatacgcaccgttctctctggaacgaatcggatcctccctgaggtgcccggcgatgcagag  
tcacttctgctcaggtcctctcccgtcatggagcgcggatccgaccgactccaagggcaagaatactccgctctcattgaggagatccagcagaacgcgaccac  
ctttgacggaaaatagccttctgaagacatacaactacagcttgggtgcagatgacctgactccctcggagaacaggagctagtcaactccggcatcaagttta  
ccagcgggtacgaatcgtcacaaggaacatcgtccattcatccgatcctctggctccagccgctgatcgcctccggcaagaaatcatcagggcttccagagc  
accaagctgaaggatcctcgtgccagcccggccaatcgtcgccaagatgcagctggctattccgaggccagctcatcaacaactctcgaccagggcacc  
tgcactgtctcgaagacagcgaattggccgataccgtcgaagcaattaccgccacgtctccctccattcgtcaacgtctggagaacgacctgtccgggtg  
actctcacagacacagaagtgacctacctcatggacatgtctcctcgcacacctccaccagcaccgtcgcaccaagctgtccccctctgtgacctgttacc  
catgacgaatggatcaactacgactacctccagtcctgaaaagtattaccggccatggtgcaggtaacccgctcggcccgaccaggcgctggctacgtaac  
gagctcatgcccgtctgaccactcgcctgtccacgatgacaccagttccaaccacactttggactcagcccggctaccttccgctcaactctactcttacgcg  
gacttttcgatgacaacggcatcatctccattcttctgtttaggctgtfacaacggcactaagccgctatctaccagaccgtggagaatatcaccagacagatg  
gattctcgtctgcttgacgggtccggttctcgcgtttgtacgtcagatgatgcagtgtagggcggagcaggagccgctggctcgtcttggtaatgatcgcgtt  
gtcccgtgatgggtgtccggtgatgcttggggagatgtaccgggatgcttctgaggggggtgagcttctagatctgggggtgattggcgaggatgtttg  
cttag

## B

atgaaggccagatcattcctatcgttctgtctacggcagggctcgtataggggcaaaccaaagaagtcaagaacgtcttcttctcgaatgtaagtcagtgctc  
tctagaacaagcatcatagattcaagagtcacaataactgatatagttgcctgatagGttcgggtcaaatgagtcggagcagaattggaagtgggaatatccagggtg  
agGtatgcagacttatatcactcctgtcaagaatcaatccagggacaagttcaagctcattaggggactggatcctaggGcaccgactacacctccccaatacaacggcgatcc  
agatactattgacgctggatgaacatctccgctgtccattcttgatggaaggatgattccgactgagatgactggatccttgatacggcttactttagggatacagcgaggtgCg  
gacctttacactccttccggcgtactttgtcctaataagataggtcaTTaattacatcaccggtaaaggagcacatgcagtagtcgacccgcacaactttggacgaTAgtaag  
aaacctttcgaacttttaacaactcaattcgaagacactactgattttccagCtatggaaccctatctcatcaacgtccgacttccagacttctgtccacactggcctccaactc  
aatcaaatgatctgtcattttcgcacagAgtaaacataccttcaatttctctcacaaccaggttctgacatactcagACAacgaataaccagacatggacgaatcgcgtgtg  
agccctcaaccaggcagccatgatggcatccgcagctggcgcacaacgcaatacatcttctgtaaggcaacgctactcggcgcctggacttggacaactacaactg  
ccatggtcaacctcactgaccttctgatctgctctacgagatgaccaatacctcactccgatggctccggccatcagaccaatgcgtaagcagcacagctggcgaagaac  
gtgttagatgctacgacttggftacagccaacggcaagcttggatcctcggcaggtcgcgggtggcgcgaatagttgtcgaagagccgtggagggtatgctggattttg  
gcggaactcagacgtctggcttggctcgtcgtggagtgccggtccatggtggaagactatctactcaatggagccgctaattggcattgcatatgagagtattgtcgatt  
ttggagactattttga

## B

atgcgtccatccctagtgatcgcggccttctggctggctgctcaggcagcacctcacttgcctccgcaacaaggacattgatctcaataagcttctc  
agcggccggggcaagcactggtttggcactgcagccgatatccctggaactgctgagaccaccgatgctgcgtatctcaagactgaagcagaactttggcgagat  
cacacctgtaacgaatgaaggtgttcaattgactcaatcccccttctcttactgttctcattaactttgcatgctatgctacaccgagactgagcaaa  
acgtgttcaactcaccgaggcgagcagttcctggaggtggccgagcgttccgtagcaaggtccgctgccacaaccttcttggccagccaggttccgattt  
cgtcacatccaagacctggacagccaaggagctcactgctcatgaagaaccacatctcaagacctcagcacttccgacgtcgtgttacttctgggatgtggt  
caacgaggctctcaacgggtgatggcacattctcctaaggtctgttatgacaccatcggcgaggaaactctactcattcaagatgcccaggaggcattggc

acagatcggtgccaatgatgtgaagctgtactacaacgactatggatcgcagaaccccggtaccaagtcgaccgccgttcttcagctcgtcagcaacctgcgtaagc  
gcggtattcgattgacgggtgttggttggaatcacactttatcgtgggcgaaactccttcttccgatcaactgccacgaagcaggcctacatcaaggccaacct  
ggatgttctgtcagggacttgacgttcgcttctcgactgtccatattacaccgctccgctcagaagcagcaggctgaggactactatgtgagcgtgccagttg  
catgaatgctggctcctcgttgattgggtgtggtgtttgggactttgatgatgcttactcctgggtcccagtgcttttctgggtcaggggtgctgtctctcaacaata  
cacttgaggcgaagccggcgtactacgccgtccgatgctctcgaggaaagccttgcaagtgtgtgctag

Рисунок 19 – Полинуклеотидные последовательности генов (А) – *phyA A.niger*, (Б)- *egl2 P.verruculosum* и (В)- *xylE P.canescens*

Полученные ПЦР-продукты были выделены с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя и элюированы в 30 мкл буфера EB.

Клонирование ПЦР-продуктов проводилось по методу независимого лигирования [9] в вектора pCBHI (для *phyA*) или pCBHISS (для *eglII* и *xylE*) в зависимости от используемых сигнальных пептидов [114]. Для образования «липких» концов ПЦР-продукты и линейаризованные вектора pCBHI или pCBHISS были подвергнуты обработке T4- полимеразой (22 °С – 30 мин, 80 °С – 30 мин; dATP для вставки, dTTP для вектора).

Лигирование вектора и вставки проводилось в течение 20 мин при 22 °С. К лигированной смеси были добавлены компетентные клетки *E. coli* Mach1. Высев трансформированных клеток проводился на агаризованную среду Lauria-Bertrani (LB, “Sigma”, США) с ампициллином (100 мкг/мл).

Из полученных рекомбинантных клонов случайным образом было выбрано по 2 клон для выращивания на среде в 5 мл LB среды с ампициллином (100 мкг/мл). Культивирование проводилось 16 ч при 37 °С и 250 об/мин. Необходимое количество плазмидной ДНК было выделено согласно стандартной методике QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, США). Отсутствие мутаций, делеций либо инсерций доказывалось секвенированием по методу Сэнгера (ООО «Синтол», Россия).

Таким образом были получены плазмиды pCBHI-*phyA*, pCBHI-*egl2* и pCBHI-*xylE* для трансформации в грибной штамм-реципиент *P.verruculosum* 537.

#### 1.2.6.2 Трансформация штамма-реципиента *Penicillium verruculosum* 537

Для трансформации использовался ауксотрофный штамм-реципиент *Penicillium verruculosum* 537  $\Delta$  *niaD*, дефектный по гену нитратредуктазы, что приводит к нарушению пути



ассимиляции нитратного азота, что приводит к неспособности штамма к росту на чашках с нитратом натрия. При трансформации штамма- реципиента трансформирующей плазмидой pSTA10 (с геном нитратредуктазы *Aspergillus niger*) происходит комплементация дефектного гена, что приводит к прототрофности штамма с возможностью роста его на средах с 10 мМ нитрата натрия. В основе трансформации лежит модифицированная CaCl<sub>2</sub>-ПЭГ методика, разработанная ранее для штамма *Penicillium canescens* [56].

Протопласты для трансформации получали согласно лабораторной методике, все буферы, использованные как для получения протопластов, так и для трансформации, кроме буфера с ПЭГ-4000, стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм в течение 30 мин. Буфер с ПЭГ-4000 стерилизовали кипячением в течение 20 мин на водяной бане.

В начале делали посев смывом спор с культуры гриба в 100 мл минимальной среды с NH<sub>4</sub>Cl, колбы с посевом инкубировали в шейкере при 30°C и 200-250 об/мин в течение 12-14 ч.

Затем фильтровали мицелий, ресуспендировали его в буфере с pH 5,6-5,8 добавляли 15 мг/мл лизирующего фермента из *T.harzianum* и 2,5 мг/мл БСА и инкубировали 2-3 ч при 30°C в шейкере (200-500 об/мин).

Далее переносили гидролизат в стерильную центрифужную пробирку, наслаивали буфер с концентрацией сорбитола 0,6 М, центрифугировали, отбирали слой протопластов на границе раздела фаз и перерастворяли их в буфере с концентрацией сорбитола 1,2 М. Количество полученных протопластов определяли при помощи камеры Горяева по формуле:

количество протопластов в 1 мл = X 4 10<sup>6</sup>,

где X- количество протопластов в маленькой клетке камеры Горяева.

На одну трансформационную точку брали 3\*10<sup>7</sup> протопластов, растворенных в 200 мкл буфера SCT (1,2 М сорбитол, 10 мМ трис-HCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5), 10 и 1 мкг целевой (pCBHI-phyA либо pCBHI-egl2 либо pCBHI-xylE) и котрансформационной ДНК (pSTA10), соответственно, и 50 мкл буфера PCT (50% ПЭГ-4000, 10 мМ трис-HCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Смесь инкубировали во льду в течение 20 мин. Затем добавляли к ней 500 мкл буфера PCT, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и перерастворяли в 200 мкл 1,2 М сорбитола.

Для посева использовали чашки с нижним агаром и пробирки с верхним агаром. В состав верхнего агара входили агар-агар (0,7%), 1,2 М сорбитол, глюкоза (0,8%) и источник азота, нитрат натрия (селективная среда) или хлорид аммония (неселективная среда). Состав нижнего агара отличался только концентрацией агара – 2%. Пробирки с верхним агаром перед посевом помещали в кипящую водяную баню, чтобы расплавить агар, а затем в водяной термостат при температуре 48°C, чтобы остудить его.

Трансформационную смесь добавляли в пробирки с расплавленным и остывшим до 48°C верхним агаром, содержимое пробирки перемешивали и выливали на чашку с нижним агаром. Трансформанты высевали на селективную среду, в качестве контролей делали посев протопластов без ДНК на селективную и неселективную среду.

Чашки с трансформантами и контролями помещали в инкубатор при температуре 30°C на 5 суток.

#### 1.2.6.3 Получение ферментных комплексов, содержащих гетерологичную фитазу А 63 кДа *Aspergillus niger* и гомологичную эндо-1,4-β-глюканазу II 39 кДа *Penicillium verruculosum*

В результате котрансформации реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* 537 плазмидами рСТА10 (1 мкг) и смесью плазмид рСВНІ-phyА и рСВНІ-egl2 (по 3 мкг каждой) было получено 78 трансформантов.

Трансформанты культивировались в 100 мл предварительно стерилизованной ферментационной средой следующего состава:

КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	15 г/л
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 г/л
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,3 г/л
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.3 г/л
дрожжевой экстракт	10 г/л
целлюлоза	40 г/л
пшеничные отруби	10 г/л.

После культивирования культуральную жидкость (КЖ) центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Отфильтрованную КЖ хранили при температуре 4 °С.

Первичный скрининг трансформантов проводили по критерию концентрации белка и значениям целевых ферментативных активностей по отношению к натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ-азная активность) и фитату натрия (фитазная активность), а также проводили ДДС-гель-электрофорез. Результаты представлены в таблице 14 и на рисунке 20. В качестве контроля использовалась КЖ реципиентного штамма.

Метод определения фитазной активности основан на скорости образования свободного фосфата при гидролизе фитата Na (из риса). Для определения фитазной активности используют 1,4 мМ раствор фитата Na в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 5,0. Раствор субстрата (300 мкл) смешивают с 33 мкл раствора фермента и инкубируют 30 мин при 37°C. Реакцию останавливают добавлением 335 мкл 10%-ного раствора ТХУ (трихлоруксусной кислоты). Концентрацию свободного фосфата (Pi) определяют с помощью аммоний-молибденового реагента (13 мМ FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O/ 8,1 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>2</sub>O<sub>24</sub>\*4H<sub>2</sub>O/0,533 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Реакционную смесь инкубируют с 665 мкл свежеприготовленного реагента в течение 30 мин при комнатной температуре. Светопоглощение измеряют при 750 нм. Концентрацию Pi определяют исходя из калибровочного графика, полученного с помощью KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (0-0,2 г/л). За единицу активности принимают количество фермента, способного высвободить 1 мкмоль Pi в 1 мин [89].

Для определения эндоглюканазной (КМЦ-азной) и ксиланазной активностей используют методы, основанные на измерении скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди-Нельсона при гидролизе полисахаридных субстратов – β-глюкана ячменя, Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) и ксилана из древесины березы, соответственно. За единицу активности принимают такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС в минуту при pH 5,0 и 50°C [117].

Таблица 14 - Содержание белка и целевые активности трансформантов серии PhyEg

№ клона	Белок, мг/мл	Фитаза*, ед/мл	КМЦ-аза**, ед/мл
1	8,5	30	126
2	7,4	210	150
3	7,8	85	145
4	7,1	260	320
5	6,5	290	269
6	7,2	483	360
7	6,0	459	482
8	6,7	430	369
9	6,6	150	250
10	5,9	20	750
11	7,1	560	220
12	7,9	580	268
13	9,9	350	160
15	10,4	230	90
19	6,1	150	143
20	7,5	1410	630
21	7,3	12	174
23	6,5	620	682
25	7,2	598	501
26	9,6	1470	140
27	7,9	356	153
28	7,9	560	240
29	7,1	300	192
31	7,1	1370	72
32	7,2	950	139
33	6,7	850	720
<b>36</b>	<b>7,1</b>	<b>1690</b>	<b>860</b>
37	10,6	520	90
38	9,0	650	161.0
39	12,4	1300	107.7
40	10,2	210	98
41	9,2	254	136
42	7,9	610	265
44	10	1328	312
46	6,5	480	890
47	6,1	230	260
50	5,9	310	364
51	5,4	30	358
52	5,2	200	402
53	7,9	550	409
54	8,5	730	398
55	7,1	685	431

Продолжение таблицы 14

56	6,4	120	250
57	5,9	600	120
58	8,9	453	183
59	9,5	30	194
60	6,5	220	930
61	10,6	674	112
62	4,8	192	850
63	8,0	550	160
64	8,9	1480	110
65	6,8	310	923
66	6,2	180	1050
67	6,2	459	1120
68	7,6	330	95
69	9,2	850	160
70	10,2	121	160
71	7,7	132	210
72	7,0	210	762
73	6,4	562	698
74	9,3	10	379
75	8,8	850	170
<b>76</b>	<b>8,5</b>	<b>1890</b>	<b>935</b>
77	10,1	361	133
78	6,5	267	790
контроль	10,5	3,6	134.1

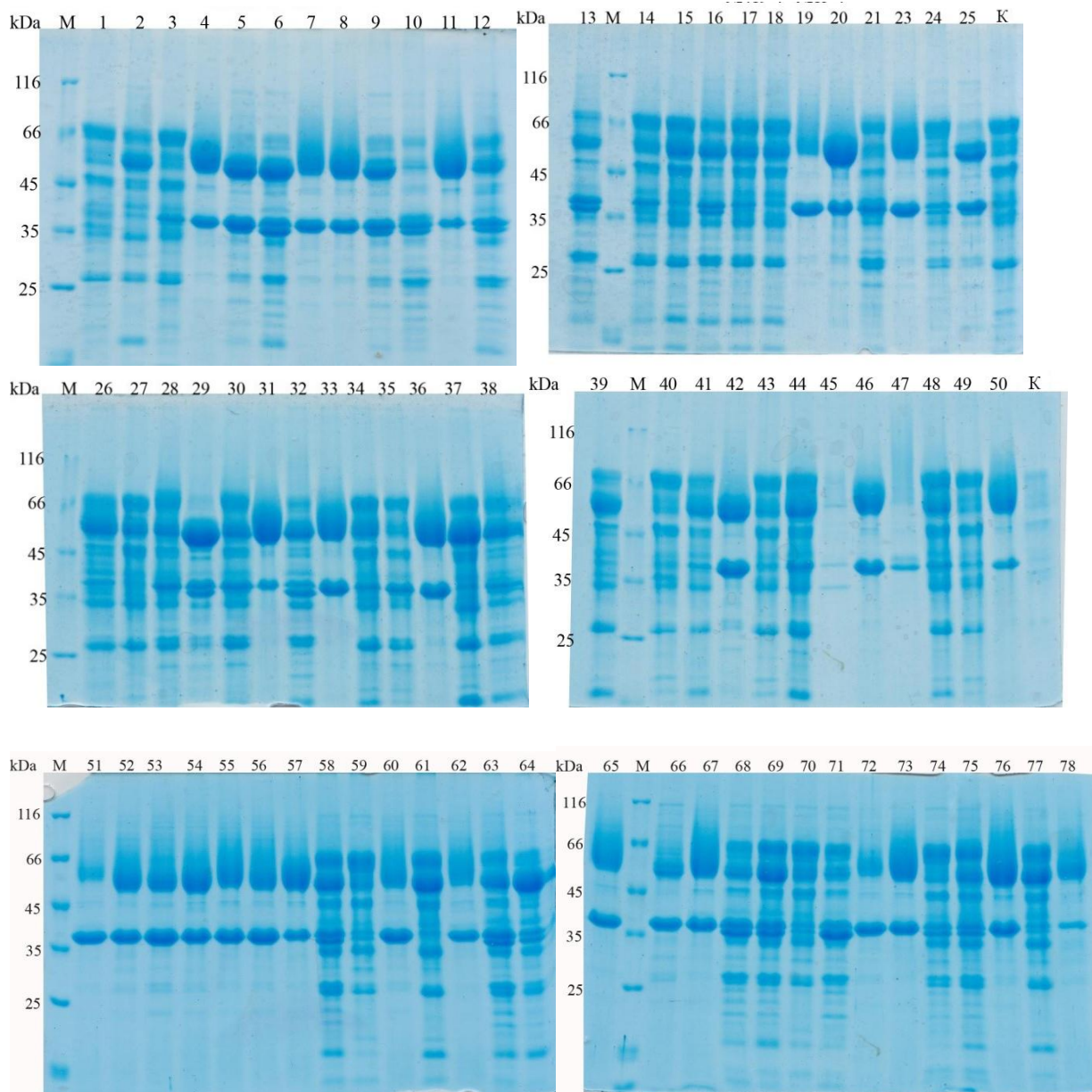


Рисунок 20 - Результаты ДДС- электрофореза трансформантов 1-78 серии PhyEg. В лунку наносилось одинаковое по объему количество КЖ (10 мкл)

В результате скрининга были отобраны два трансформанта с наибольшими значениями целевых активностей. Это трансформанты PhyEg-36 и PhyEg-76. Значения активности по отношению к фитату натрия варьировались в пределах от 1600-1900 ед/мл, а по отношению к КМЦ от 850-950 ед/мл, соответственно. Следует отметить, что на электрофореграммах данных трансформантов отчетливо наблюдаются полосы в районе 63 и 40 кДа, соответствующие фитазе

А и эндо-1,4-β-глюканазе II. Вместе с тем собственный целлюлолитический комплекс ферментов исходного штамма *P.verruculosum* почти полностью отсутствует.

Далее для клонов 36 и 76 были проведены эксперименты на стабильность экспрессии фитазы А и эндо-1,4-β-глюканазы. Для этого клоны 36 и 76 были 3 раза пересеяны на агаризованные среды методом перекола. Промежуток времени между переколами составлял 10 дней. Переколотые клоны инкубировались в суховоздушном термостате при 32 °С. Далее, споровая суспензия смывалась стерильной водой в качалочные колбы со 100 мл ферментационной среды, которые инкубировались на термостатируемом шейкере в течение 5 дней при 32 °С. Далее отбиралась и центрифугировалась КЖ, определялась ферментативная активность как описано выше. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Ферментативные активности (ед/мл) в КЖ клонов 36 и 76 серии PhyEg после 1, 2 и 3 пересевов

Пересев	Клон 36		Клон 76	
	Фитазная активность	КМЦ-азная активность	Фитазная активность	КМЦ-азная активность
1	1650±60	840±30	1900±80	910±40
2	1600±55	820±35	1920±75	910±40
3	1610±55	850±30	1890±80	905±35

Из данных таблицы 15 следует, что клоны 36 и 76 стабильны, поэтому далее была проведена наработка данных клонов в 1-л ферментерах (КФ-108, «Проинтех», Россия) о чем составлены Акты и протоколы наработки (№1 и №2), представленные в Приложении Б.

#### 1.2.6.4 Получение ферментных комплексов, содержащих гетерологичные фитазу 63 кДа *Aspergillus niger* и ксиланазу E 40 кДа *Penicillium canescens*

Методология получения данных бинарных ферментных комплексов аналогична методологии, описанной в п.1.2.6.3 для получения ферментных комплексов фитазы и эндоглюканазы.

Была проведена трансформация реципиентного штамма *P.verruculosum* 537 ( $\Delta$ niaD), кольцевыми формами плазмид, состоящих из *cbh1* промотора и нуклеотидных последовательностей, кодирующих гены *phyA* фитазы *Aspergillus niger* и *xylE* ксиланазы *Penicillium canescens*. В результате трансформации было получено 69 трансформантов.

Трансформанты были культивированы в колбах с предварительно стерилизованной (1 атм в течение 1 часа) ферментационной средой следующего состава:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15 г/л
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 г/л
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 г/л
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.3 г/л
дрожжевой экстракт	10 г/л
целлюлоза	40 г/л
пшеничные отруби	10 г/л.

После культивирования культуральную жидкость (КЖ) центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Отфильтрованную КЖ хранили при температуре 4 °С.

Первичный скрининг трансформантов проводили по результатам определения ключевых параметров, к которым относятся содержание белка и значения целевых ферментативных активностей по отношению к ксилану и фитату натрия, а также проводили ДДС- электрофорез. Результаты представлены в таблице 16 и на рисунке 21. Контролем как и в предыдущем случае была КЖ реципиентного штамма.



Таблица 16 - Содержание белка и целевые активности трансформантов серии PhyXyl

№ клона	Белок, мг/мл	Фитаза, ед/мл	Ксиланаза, ед/мл
1	5,7	215	42
<b>2</b>	<b>7,3</b>	<b>1620</b>	<b>867</b>
3	4,2	4	123
5	5,2	142	148
7	5,9	210	47
8	3,4	6	32
9	7,3	1940	129
11	3,9	15	142
13	6,7	246	98
14	6,1	169	107
15	8,6	54	308
16	8,3	1	286
19	7,3	321	47
20	5,6	139	117
21	8,5	358	74
23	4,1	99	103
25	6,5	253	68
26	4,1	148	76
27	6,4	364	63
29	5,9	238	62
30	9,1	242	84
33	9,5	1470	789
34	5,6	198	65
35	5,0	189	83
36	5,9	347	82
37	7,6	414	105
38	4,6	45	93
40	6,8	361	142
41	5,2	286	54
43	6,6	369	50
44	6,5	60	30
46	6,5	149	117
<b>47</b>	<b>7,3</b>	<b>1580</b>	<b>830</b>
48	6,0	170	178
49	11,5	16	350
50	8,5	270	108
51	6,8	1750	712
52	9,5	170	204

Продолжение таблицы 16

53	6,9	223	59
54	6,2	159	45
55	11,0	6	1405
56	12,2	1170	1050
57	7,5	306	54
58	5,9	204	54
59	11,2	1630	642
60	12,1	17	455
61	8,6	322	100
62	6,1	145	154
63	11,3	8	399
64	5,2	129	69
65	9,2	1860	320
66	8,3	274	152
67	11,8	357	263
68	11,5	23	428
69	12,0	111	313
контроль	10,5	4	170

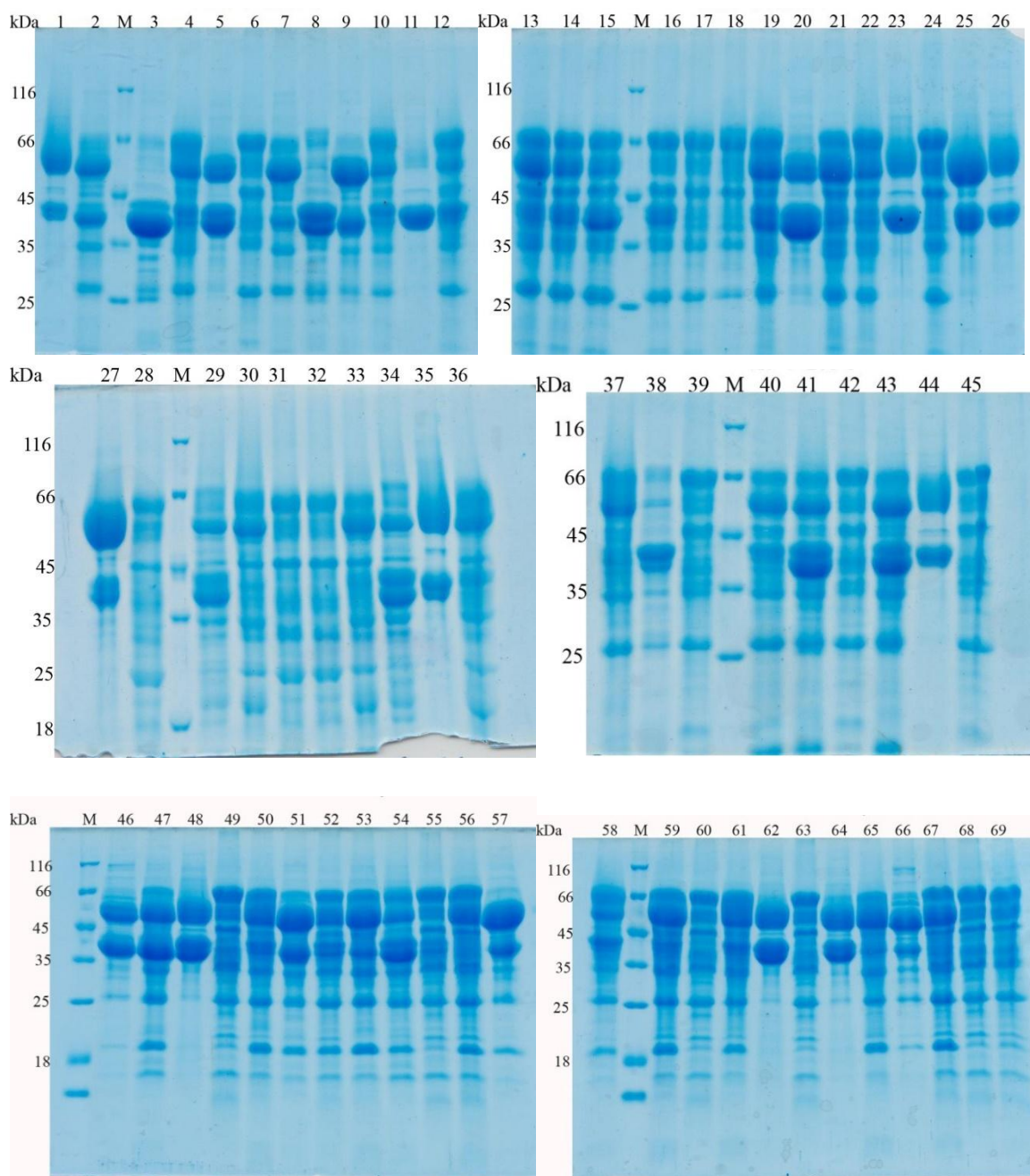


Рисунок 21- Результаты ДДС- электрофореза трансформантов 1-69 серии PhyXyl. В лунку наносилось одинаковое по объему количество КЖ (10 мкл)

В результате скрининга были отобраны два трансформанта с наибольшими значениями целевых активностей. Это трансформанты PhyXyl-2 и PhyXyl-47. Значения активности по отношению к фитату натрия варьировались в пределах от 1500-1600 ед/мл, а по отношению к ксилану от 800-870 ед/мл, соответственно. Следует отметить, что на электрофореграммах

данных трансформантов отчетливо наблюдаются полосы в районе 63 и 40 кДа, соответствующие фитазе А *A.niger* и ксиланазе Е *P.canescens*.

Далее для клонов 2 и 47 были проведены эксперименты на стабильность экспрессии фитазы А и эндо-1,4-β-ксилназы. Для этого клоны 2 и 47 были 3 раза пересеяны на агаризованные среды методом перекола. Промежуток времени между переколами составлял 10 дней. Переколотые клоны инкубировались в суховоздушном термостате при 32 °С. Далее, споровая суспензия смывалась стерильной водой в качалочные колбы со 100 мл ферментационной среды, которые инкубировались на термостатируемом шейкере в течение 5 дней при 32 °С. Далее отбиралась и центрифугировалась КЖ, определялась ферментативная активность как описано выше. Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Ферментативные активности (ед/мл) в КЖ клонов 2 и 47 серии PhyXyl после 1, 2 и 3 пересевов

Пересев	Клон 2		Клон 47	
	Фитазная активность	Ксиланазная активность	Фитазная активность	Ксиланазная активность
1	1590±70	840±30	1610±70	970±40
2	1630±55	790±25	1620±55	940±30
3	1580±65	860±40	1590±70	930±35

Из данных Таблицы 17 следует, что клоны 2 и 47 стабильны, поэтому далее была проведена наработка данных клонов в 1-л ферментерах (КФ-108, «Проинтех», Россия) о чем составлены Акты и протоколы наработки (№3 и №4), представленные в Приложении Б.

### 1.2.7 Получение сухих форм ферментных препаратов серии PhyXyl и PhyEg:

- проведение ферментации рекомбинантных штаммов из п. 1.2.6. на стандартных ферментационных средах для *P.verruculosum* на лабораторном ферментационном комплексе;
- отделение, микрофльтрация и высушивание культуральной жидкости;
- определение ферментативных активностей по – глюкану (ГОСТ 34176-2017), ксилану (ГОСТ Р55302-2012) и фитату натрия (ГОСТ 31487-2012)

#### *1.2.7.1 Проведение ферментации рекомбинантных штаммов из п.п 1.2.6.3 -1.2.6.4 на стандартных ферментационных средах для P. verruculosum на лабораторном ферментационном комплексе*

Культивирование штамма-продуцента в ферментере является одной из основных стадий в биотехнологической цепочке получения промышленных ферментных препаратов, выход которых в значительной степени зависит от состава питательной среды и условий культивирования соответствующих штаммов-продуцентов. Кроме того, каждый новый продуцент может обладать отличными от других штаммов физиологическими особенностями и, соответственно, биосинтетической способностью при культивировании в одних и тех же условиях. Поэтому проведение исследований, направленных на изучение особенностей биосинтеза целевых внеклеточных ферментов новыми штаммами-продуцентами при культивировании в ферментере в стандартных условиях для данного конкретного микроорганизма, является важной задачей.

Целью работы на данном этапе было получение образцов сухих форм ферментных препаратов четырех рекомбинантных штаммов серии PhyEg (36, 76) и PhyXyl (2, 47) в 1,5-литровых лабораторных ферментерах в режиме fed-batch.

Периодическое культивирование новых штаммов-продуцентов проводили на ферментационной установке “КФ-108“, рисунок 22, оснащенной четырьмя 1,5-литровыми ферментерами с рабочим объемом 0,7 л. при температуре 32 °С и рН ферментационной среды 5,0. Заданное значение рН ферментационной среды поддерживалось автоматически путем подачи растворов NH<sub>4</sub>OH и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Парциальное давление кислорода в ферментационной среде (pO<sub>2</sub>) поддерживали автоматически на уровне 30% от насыщения изменением скорости перемешивания и интенсивности аэрации. Расход воздуха - 0,4 л/мин. Ферментер “КФ-108“ снабжен барбатирующим и перемешивающим устройствами, системой термостатирования и рядом других устройств. Перемешивание осуществлялось турбинной мешалкой, приводимой во вращение электродвигателем с прямым приводом, управляемым регулятором оборотов,

интервал скорости вращения – 0-1000 об/мин. Регулирование температуры осуществлялось при помощи теплообменного устройства, состоящего из рубашки аппарата и нагревателя.

Культуры новых штаммов поддерживали на агаризованной среде СМ-агар для поддержания и хранения грибных культуры (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 10,0; глюкоза – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; агар - 20,0.

Среда для инокулята была неизменной (такой же как в пробных ферментациях, см Акты и протоколы наработки рекомбинантных штаммов) (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 15,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 5,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,23; глюкоза – 15,0; дрожжевой экстракт – 10,0; вода дистиллированная.

Однако в ферментационной среде для культивирования в ферментерах были введены изменения, состоящие в замене дорогостоящей глюкозы на более дешевую патоку в эквиваленте 4% глюкозы. Таким образом, состав ферментационной среды был (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 7,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,23; патока – 57,0; МКЦ – 40,0; пшеничные отруби – 10,0; дрожжевой экстракт – 10,0; вода дистиллированная.

Было проведено периодическое культивирование рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* PhyEg - 36, *P. verruculosum* PhyEg - 76 и *P. verruculosum* PhyXyl - 2, *P. verruculosum* PhyXyl - 47, в 1,5-литровых ферментерах лабораторной ферментационной установки «КФ-108».

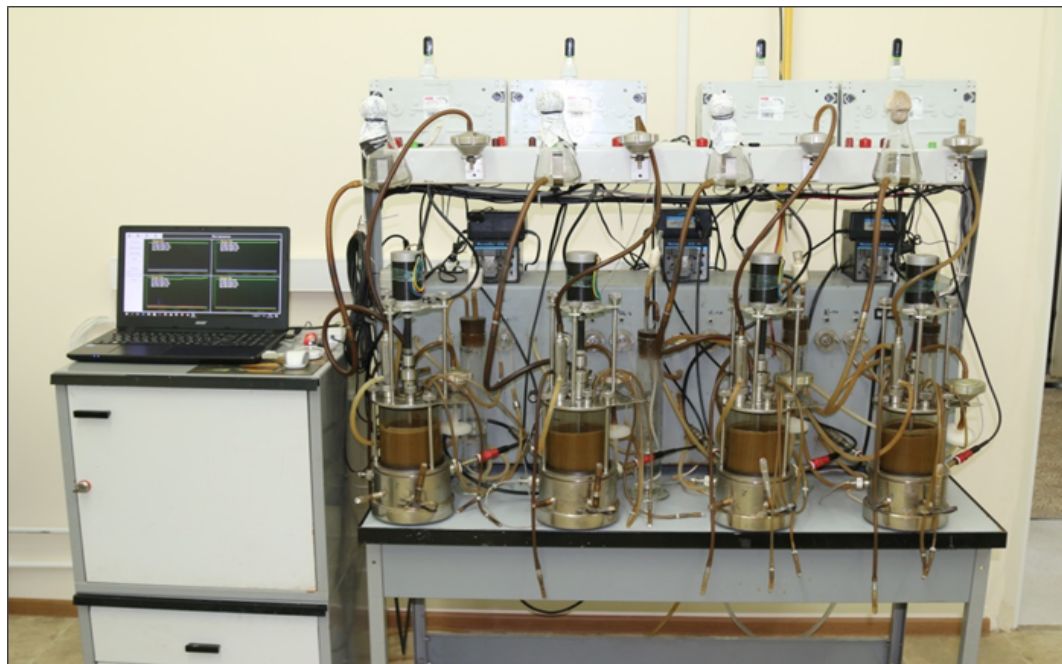


Рисунок 22 - Ферментационная установка КФ-108 («Проинтех», Россия)

Для этого штаммы, хранящиеся на косяках в споровом состоянии, были рассеяны в колбы методом смыва (споры смывались 10 мл стерильной дистиллированной воды в качалочные колбы, объёмом 750 мл., с 90 мл. стерильной инокулянтной среды) и оставлены в термостатируемой качалке на 48 часов при температуре 32<sup>0</sup>С и 200 оборотах в минуту.

В течение 48 часов, пока рос инокулят, были подготовлены ферментёры с 600 мл. ферментационной среды (без глюкозы, глюкоза стерилизовалась отдельно в колбах по 100 мл. при 1110С на протяжении 30 минут) в них и простерилизованы 2 раза при 120<sup>0</sup>С 1 час. После стерилизации аппараты были полностью подключены, выведены на режим и оставлены на сутки для проверки стерильности среды.

Выросший инокулят (по 100 мл.) был стерильно перенесён в аппараты, туда же была добавлена стерильная глюкоза ( по 100 мл.), был доведён рН и выставлен режим хемостата. Процесс длился 144 часа при температуре 32<sup>0</sup>С, уровне рН в районе 5.0 и значении PO<sub>2</sub> датчика на уровне 30%. В процессе культивирования было внесено 4 добавки стерильного 50 % раствора глюкозы (по 60 мл.) и 3 добавки стерильного 4,8% суспензии МКЦ (по 50 мл.).

По прошествии 144 часов, процесс был остановлен, культуральная жидкость слита и центрифугована при 6000 оборотах в минуту в течение 30 минут. Были отобраны пробы для измерения целевых активностей ферментов и концентрации белка. Супернатант штаммов был высушен по методике, описанной ниже.

Активности по карбоксиметилцеллюлозе (ГОСТ Р 55293-2012) и ксилану березовому (ГОСТ Р 55302-2012) определяли по начальной скорости образования ВС (методом Шомоди-Нельсона). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмольа восстанавливающих сахаров (в глюкозном эквиваленте) из 0,5% раствора субстрата, образующихся за 1 минуту реакции при температуре 50<sup>0</sup>С и значении рН 5.0.

Активность по отношению к фитату натрия определяли по методике (ГОСТ 31487-2012). Метод основан на количественном определении содержания неорганических фосфатов, образующихся в результате действия фермента фитазы на субстрат - фитат натрия (натриевую соль фитиновой кислоты) при определенных стандартных условиях, путем их связывания молибдатом натрия и восстановлением двуххлористым оловом с образованием окрашенного в синий цвет комплекса - молибденовой сини. За единицу фитазной активности (1 ед.) принимали количество фермента, катализирующее гидролиз фитата натрия с образованием 1 мкмольа

неорганического фосфата за одну минуту в стандартных условиях (температура - 37 °С, значение рН 5,5, продолжительность гидролиза - 15 мин).

Активность  $\beta$ -глюкозидазы определяли с использованием (п-НФ- $\beta$ -Глю) пара-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида (Sigma). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое освобождает из субстрата 1 мкмоль *n*-нитрофенола за 1 мин при 40°С.

Содержание белка в КЖ, а также в ферментных препаратах определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр GENESYS TM6 фирмы «Thermo Spektronik» (США). Результаты измерений представлены в таблице 18.

Таблица 18 - Результаты измерений активности в сливах культуральной жидкости штаммов-продуцентов в конечной точке культивирования

	<i>P.verruculosum</i> PhyEg-36	<i>P.verruculosum</i> PhyEg-76	<i>P.verruculosum</i> PhyXyl-2	<i>P.verruculosum</i> PhyXyl-41
	Максимальная активность, ед/мл			
Ксиланаза	51,1	65,5	653,3	1047,4
КМЦ-аза	870,4	878,3	363,4	76,5
Фитаза	1304,9	1803,2	1177,9	1360,5
$\beta$ -глюкозидаза	8,9	10,6	9,7	9,3
Белок, мг/мл (без ацетона)	30,0	39,2	33,5	36,8
	Суммарная активность ферментов в супернатанте слива (ед x 1000)			
Ксиланаза	37,8	61,8	546,8	1041,1
КМЦ-аза	783,4	828,2	304,2	76,0
Фитаза	1174,4	1700,4	985,9	1352,3
$\beta$ -глюкозидаза	8,0	10,0	8,1	9,2
Белок, мг/мл (без ацетона)	27,0	37,0	28,0	36,6
	Удельная активность фермента в супернатанте слива, ед/мг белка			
Ксиланаза	1,7	1,7	19,5	28,5
КМЦ-аза	29,0	22,4	10,9	2,1
Фитаза	43,5	46,0	35,2	37,0
$\beta$ -глюкозидаза	0,3	0,3	0,3	0,3
	Объемно-весовые характеристики и конечная вязкость			
Объем слива, мл	1000	1060	1080	1040
Вязкость, сPs	48	24	231	51
Объем супер-та, мл	900	943	837	994
Вязкость, сPs	~ 10	~ 10	~ 10	~ 10
Вес сыр. б/м, г/л	124	128	181	155



Из таблицы видно, что серия продуцентов *P.verruculosum* PhyEg отличается высоким уровнем активностей по отношению к фитату натрия и КМЦ, а серия продуцентов *P.verruculosum* PhyXyl обладает высоким уровнем активности по отношению к фитату натрия и ксилану, что согласовывается с поставленной задачей. Наряду с целевыми активностями, следует отметить, что уровень активности по отношению к пНФ-глюкопиранозиду сравнительно низкий, что, по-видимому, связано с изменениями состава собственного комплекса ферментов исходного штамма.

#### *1.2.7.2 Отделение, микрофильтрация и высушивание культуральной жидкости*

Сухие ферментные препараты могут быть получены двумя способами:

*Получение сухих форм ферментных препаратов путем лиофильного высушивания.*

Жидкие ФП (супернатанты, полученные при центрифугировании культуральной жидкости штаммов *P. verruculosum* PhyEg - 36, *P. verruculosum* PhyEg - 76 и *P. verruculosum* PhyXyl - 2, *P. verruculosum* PhyXyl – 47 были разлиты в специальные ёмкости по 100 мл, заморожены при – 76<sup>0</sup>С и лиофильно высушены при температуре – 56<sup>0</sup>С в вакууме 31 мТ. На рисунке 23 показана фотография лиофильной сушки («VirTis SP scientific», США), на котором был проведен данный эксперимент. Следует отметить, что в данном случае, никакие параметры получения сухих форм ФП из жидкой формы не изменялись, в виду того, что данная лиофильная сушка работает исключительно при параметрах, заданных производителем.



Рисунок 23 - Сушка лиофильная VirTis sp scientific sentry 2.0

Жидкий ферментный препарат был разлит в ёмкости по 80 мл. и высушивался при разных режимах на распылительной сушилке Buchi mini spray dryer B-290, представленной на рисунке 24. Надо отметить, что использование распылительной сушилки позволяет максимально приблизить процесс лабораторного получения ФП к техническим регламентам производства, поэтому ее использование наиболее перспективно для дальнейшего внедрения в производство.



Рисунок 24 - Сушка распылительная Buchi mini spray dryer B-290

Параметры, которые изменялись при подборе оптимального режима для распылительного высушивания жидких ферментных препаратов:

- Температура на входе

Температура в распылительной головке, один из ключевых параметров. При слишком высокой температуре ферментный препарат «сгорает», при слишком низкой - не успевает высохнуть и вместе с жидкостью попадает в распылительный циклон. Нами исследовался диапазон температур от 150°C на входе до 100°C.

- Скорость подачи жидкого ферментного препарата в распылительную головку

Этот параметр отвечает не только за время сушки, но и за температуру на выходе сухого препарата из распылительного цилиндра в циклон и сборник. Чем выше скорость подачи, тем быстрее идёт процесс высушивания и тем ниже температура на выходе (что хорошо), но при этом при слишком высокой скорости препарат может просто не успевать высохнуть и попадает в сборник с высокой степенью влажности. При слишком низкой скорости подачи, температура на выходе приближается к температуре на входе и препарат просто сгорает (время взаимодействия препарата в точке выхода из распылительной камеры в циклон значительно больше, чем время взаимодействия в распылительной головке, поэтому то, что не сгорает в распылительной головке, плавится при той же температуре в распылительном цилиндре). Мы

выставляли скорости подачи супернатанта культуральной жидкости в сушку от 10 мл/мин. до 1 мл/мин.

- Аспирация

Ещё один параметр, отвечающий за влажность конечного продукта. При слишком высоком уровне аспирации сухой ферментный препарат сильно пылит, что ведёт к большим потерям при его сборе. При слишком низком уровне – препарат получается влажным. Нами рассматривался процент аспирации от 100% до 60%

Таким образом, изменяя эти 3 параметра, нами было установлено следующее:

При температурах выше 130 градусов ферментные препараты сгорают либо полностью, либо не менее чем на 50%, при любых комбинациях остальных параметров. При температуре ниже 110 градусов препарат, до конца, не высыхает ни при каких других условиях. Таким образом, был установлен рабочий диапазон входящей температуры от 110 до 130 °С.

В этом рабочем диапазоне было выявлено, что независимо от уровня аспирации, при скорости подачи жидкого сухого препарата больше 8,0 мл/мин в распылительный цилиндр пробрасывается жидкость и конечный продукт сильно увлажнён, а при скорости подачи ниже 5 мл/мин выходящая температура становится неприемлемо высокой и влияет на стабильность ферментов. Исходя из этих наблюдений нами был выбран диапазон скорости подачи супернатанта культуральной жидкости от 5 мл/мин до 8 мл/мин.

Исследование последнего ключевого параметра – аспирации – показало, что при любых комбинациях, подобранных выше диапазонов, аспирация выше 80% ведёт к сильному пылению, а ниже 55% к образованию влажности в конечном продукте. Таким образом, рабочий диапазон по аспирации получился от 55 до 80 %.

*1.2.7.3 Определение ферментативных активностей по -глюкану (ГОСТ 34176-2017), ксилану (ГОСТ Р 55302-2012) и фитату натрия (ГОСТ 31487-2012)*

Активности по карбоксиметилцеллюлозе (ГОСТ Р 55293-2012), ксилану березовому (ГОСТ Р 55302-2012) и бета-глюкану (ГОСТ 34176-2017) определяли по начальной скорости образования ВС (методом Шомоди-Нельсона). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоля восстанавливающих сахаров (в глюкозном эквиваленте) из 0,5% раствора субстрата, образующихся за 1 минуту реакции при температуре 50°C и значении рН 5.0.

Активность по отношению к фитату натрия определяли по методике (ГОСТ 31487-2012). Метод основан на количественном определении содержания неорганических фосфатов, образующихся в результате действия фермента фитазы на субстрат - фитат натрия (натриевую соль фитиновой кислоты) при определенных стандартных условиях, путем их связывания молибдатом натрия и восстановлением двухлористым оловом с образованием окрашенного в синий цвет комплекса - молибденовой сини. За единицу фитазной активности (1 ед.) принимали количество фермента, катализирующее гидролиз фитата натрия с образованием 1 мкмоль неорганического фосфата за одну минуту в стандартных условиях (температура - 37 °С, значение рН 5,5, продолжительность гидролиза - 15 мин).

Активность  $\beta$ -глюкозидазы определяли с использованием (п-НФ- $\beta$ -Глю) паранитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозид (Sigma). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое освобождает из субстрата 1 мкмоль *n*-нитрофенола за 1 мин при 40°С.

Содержание белка в КЖ, а также в ферментных препаратах определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Из таблицы 19 следует, что ферментные препараты серии PhyEg обладают высокими целлюлазной и фитазной активностями. Так, активность по отношению к КМЦ регистрировалась в районе 3300 ед/г, а по отношению к фитату натрия от 24300 до 34000 ед/г сухого препарата, соответственно.

Для препаратов серии PhyXyl уровень ксиланазной активности достигал значений в диапазоне от 20711 до 29540 ед/г сухого препарата, а активность к фитату натрия была от 24342 до 29500 ед/г, что в 4-6 раз превышает минимальный (5000 ед/г) необходимый уровень данной активности в соответствии с заданием. Следует отметить, что для всех ферментных препаратов наблюдается высокая продуктивность белка. Уровень белка в ферментном препарате варьировался от 539 до 630 мг/г сухого препарата.

Таблица 19 - Результаты изменения целевых активностей в сухих ферментных препаратах

Ферментный препарат	Белок, мг/г	КМЦ-ед/г	$\beta$ -Глюкан, ед/г	<i>n</i> -НФ- $\beta$ -глюкопиранозид, ед/г	Ксилан, ед/г	Фитат, ед/г
PhyEg-36	539±24	3312±120	2194±98	224±11	1736±87	24347±729
PhyEg-76	630±22	3361±118	2437±104	242±12	1962±91	34461±956
PhyXyl-2	572±28	2188±111	2215±96	619±23	20711±471	24342±812
PhyXyl-47	616±33	665±32	609±29	193±8	29540±512	28476±859

Из данных таблицы 19 следует, что все ферментные препараты (по 2-а ФП каждой серии) соответствуют требованиям проекта. Акт и протоколы наработки лабораторных образцов сухих форм ферментных препаратов прилагаются в составе отчетной документации в виде отдельного документа, приложение Б.

- Получены плазмидные конструкции для трансформации штамма-продуцента *P.verruculosum* 537  $\Delta$ niaD<sup>-</sup>, содержащие гены *phyA* фитазы *Aspergillus niger*, *egl2* эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы II *Penicillium verruculosum* и *xylE* ксиланазы E *Penicillium canescens*.
- Проведена трансформация штамма-реципиента *P.verruculosum* 537  $\Delta$ niaD, попарно составленными комбинациями плазмид для получения штаммов-продуцентов, содержащих фитазу A *Aspergillus niger* и эндо-1,4- $\beta$ -глюканазу II *Penicillium verruculosum*, и фитазу A *Aspergillus niger* совместно с ксиланазой E *Penicillium canescens*. Получены трансформаты, содержащие пары целевых ферментов, проанализирована их специфическая активность. Наибольшими целевыми активностями (фитазной и КМЦ-азной) в серии фитаза+эндоглюканаза обладали штаммы *P.verruculosum* PhyEg-36 и PhyEg-76. Для серии фитаза+ксиланаза наибольшими активностями (фитазной и ксиланазной) обладали штаммы *P.verruculosum* PhyXyl-2 и PhyXyl-47.
- Проведено глубинное культивирование отобранных штаммов-продуцентов целевых ферментов. Полученная культуральная жидкость была отфильтрована, центрифугирована и высушена на распылительной сушке. Получены сухие ферментные препараты -PhyEg-36, PhyEg-76; PhyXyl-2, PhyXyl-47.
- Для серии ферментных препаратов, содержащих фитазу A *Aspergillus niger* и эндо-1,4- $\beta$ -глюканазу II *Penicillium verruculosum*, удалось достигнуть уровень фитазной активности в диапазоне от 24300 до 34000 ед/г, а целлюлазной активности по  $\beta$ -глюкану – от 2100 до 2400 ед/г сухого препарата.
- Для серии ферментных препаратов, содержащих фитазу A *Aspergillus niger* и ксиланазу E *Penicillium canescens*, достигнут уровень фитазной активности в диапазоне от 24300 до 24800 ед/г, а ксиланазной активности – от 20700 до 29500 ед/г сухого препарата.

### 1.2.8 Разработка генетических конструкций для нокаута маркерного гена *niaD*, кодирующего нитратредуктазу в рекомбинантных штаммах *P.verruculosum* PhyXyl и PhyEg методом CRISPR/Cas9

Проблема, для решения которой необходимо адаптировать систему геномного редактирования CRISPR/CAS9 для гриба *Penicillium verruculosum* состоит в невозможности проведения трансформации данного гриба более, чем двумя целевыми плазмидами одновременно. Мицелиальный гриб *P. verruculosum* 537 имеет ауксотрофный признак по гену *niaD*, кодирующему фермент нитратредуктазу, который участвует в пути ассимиляции нитратного азота. При проведении трансформации с участием плазмиды pSTA10 с полноразмерным геном *niaD* *Aspergillus niger* происходит комплементация дефектного гомологичного гена *niaD* и штамм возвращается к прототрофному состоянию, т.е. растет на средах с нитратным азотом. Однако, нами неоднократно показано, что внедрение более чем двух экзогенных целевых ДНК в протопласты реципиентного штамма путем использования отработанной трансформационной системы – невозможно. Это ограничение может объясняться по крайней мере двумя причинами: 1) при трансформации ДНК в количестве большем, чем 8 мкг, протопласты реципиента лопаются и не регенерируют, 2) количество событий, при которых в геномный материал гриба внедряются более 2-х целевых плазмид – мало. Конечно, добиться получения «триплетов» по классической трансформационной схеме возможно но значительно проще и быстрее получить новые реципиенты на основе бинарных рекомбинантных штаммов с помощью метода CRISPR/CAS и трансформировать их третьей плазмидой (с геном либо *hylE*, либо *eglIII*) для внесения третьей целевой активности (либо ксиланазной, либо эндоглюканазной) в ферментативный комплекс, предназначенный для кормопроизводств.

Для повторного получения штаммов с генотипом  $\Delta niaD$  необходимо произвести нокаут гена (*niaD*) *A. niger*, которым был комплиментирован гомологичный ген *niaD* в процессе получения бинарных штаммов, системой редактирования генома CRISPR/Cas. В текущем проекте нами была получена плазмида pGCS, которая содержит ген *cas9* под контролем конститутивного промотора *gpdA* *P. veruculosum* и последовательность, кодирующую sgRNA со спейсером специфичным для гена *niaD* *A. niger*., рисунок 25.

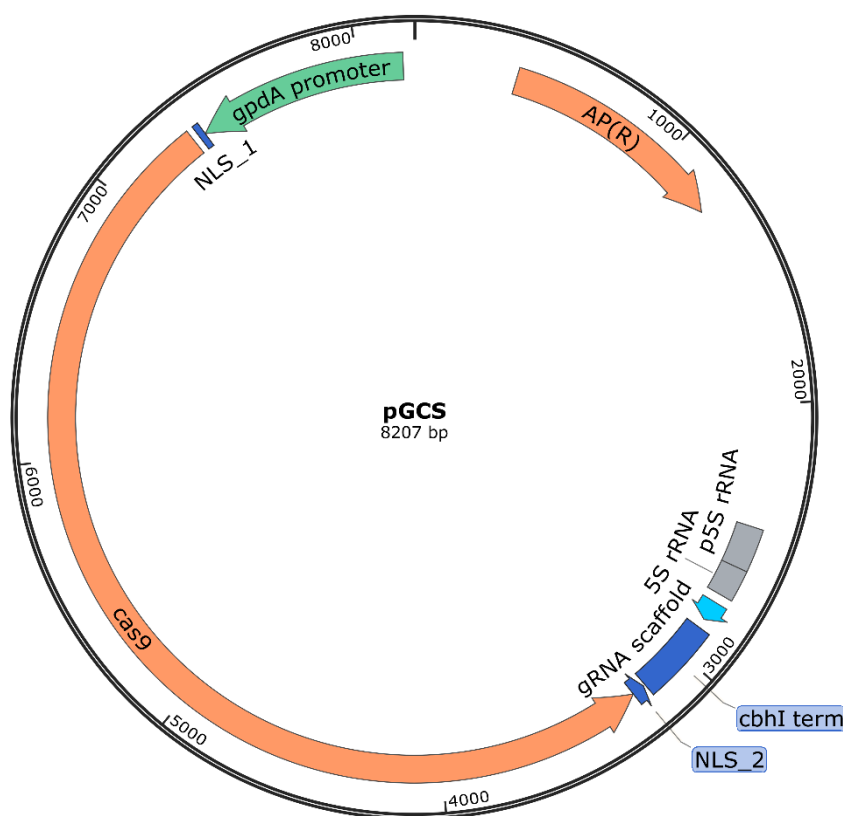


Рисунок 25 – Карта плазмиды pGCS

В плазмиде pGCS транскрипция гена *cas9* контролируется конститутивным промотором *gpdA* и терминатором *cbh1* *P. verruculosum*. На 5'- и 3'-концах гена *cas9* расположены последовательности, кодирующие сайты внутриядерной локализации. Для транскрипции последовательности кодирующей sgRNA используется промотор 5S рРНК гриба *A. niger*.

Используемый нами промотор *gpdA* является одним из наиболее часто используемых для экспрессии гена *cas9*, при проведении геномного редактирования в мицелиальных грибах [85]. Ранее нами была подтверждена его эффективность для экспрессии гена *cas9* в мицелиальном грибе *P. verruculosum* [40].

Промотор 5S rRNA является консервативным промотором РНК-полимеразы III, которую удобно использовать для транскрипции sgRNA. Эффективность использования данного промотора была продемонстрирована в работах [1; 25]

Подбор спейсера специфичного для гена *niaD* *A. niger* проводился в программе ChopChop, таблица 20 (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) [19].

Таблица 20 – Последовательности протоспейсеров, предлагаемые программой ChopChop для нокаута гена *niaD* *A. niger*

Ранг	Протоспейсер	GC (%)	Позиция	Само-комплиментарность	Эффективность
1	aatgtggtcaggaagaccaaagg	45	111	2	69.52
2	cagacggaaggagcagaatgtgg	55	127	0	66.08
3	tcaaaggcttcgcactccgtagg	55	25	0	61.85
4	gaagaccaaaggtttctcatggg	40	100	0	55.78
5	agaaccccatgagaaacctttgg	45	95	0	53.84

Из таблицы 20 следует, что из пяти наиболее эффективных протоспейсеров следовало выбрать №3, так как он наиболее близко расположен к началу гена.

Для получения плазмиды pGCS вначале была получена плазмида p5SN путём лигирования спейсера для нокаута гена *niaD* из плазмиды pSTA10 в ранее полученную плазмиду p5S-Bbs-gRNA (данная плазмида была получена в рамках проекта РФФИ 18-29-07070).

Далее фрагмент содержащий последовательности промотора 5S pPHK и sgRNA со спейсером для нокаута гена *niaD* *A. niger* из плазмиды p5SN был клонирован в плазмиду pGPDCas9 (данная плазмида была получена в рамках проекта РФФИ 18-29-07070) по рестрикционным сайтам BamHI и SalI.

Перед повторной трансформацией полученных штаммов плазмидой pSTA10 необходимо будет убедиться в отсутствии интеграции в их геном гена *cas9* для чего можно следует использовать праймеры CasStopR2: cgacacagtcagaattactttttctttttgcctggcc и CasGFPSD7: ggtggccaaagtggaaaagg.

Помимо предложенной схемы получения комплексных ФП был предложен еще один вариант. Ранее было показано, что использование для трансформации плазмид содержащих фрагмент AMA1, выделенный из геномной ДНК *Aspergillus nidulans* позволяет избежать интеграции таких плазмид в хромосомную ДНК гриба [7; 59]. Таким образом, нами была сконструирована плазмида pGCSA, рисунок 26, содержащая ген *cas9* под контролем конститутивного промотора *gpdA* *P. veruculosum* и последовательность, кодирующую sgRNA со спейсером специфичным для гена *niaD* *A. niger*, а также последовательность AMA1. Плазмида pGCSA получена путём клонирования последовательности AMA1 в плазмиду pGCS, по методу Гибсона. Для этого были подобраны две пары праймеров:



для амплификации последовательности плазмиды pGCS:

pGCSF: TCCGCTGAGGGTTTAATTAagggtgctggggctgg

pGCSRev: TTTCTAGAGAATAGGAACTTgcttacagacaagctgtgaccg

для амплификации фрагмента AMA1 с геномной ДНК *A. nidulans*, взятой в качестве матрицы:

Ama1F: gtcacagcttgctgtaagcAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCTG и  
AMA1Rev: ttaagccagccccgacaccTTAATTAACCCTCAGCGGAAACAG –.

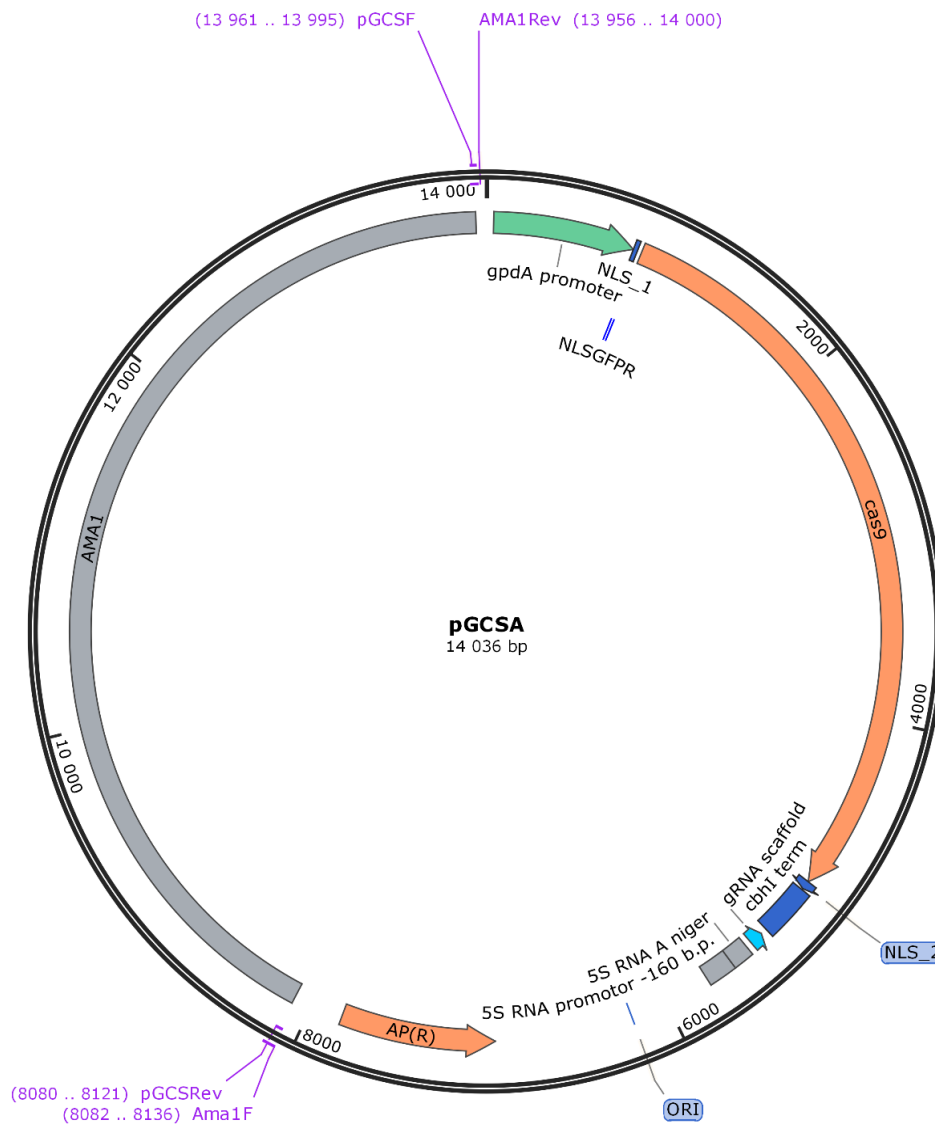


Рисунок 26 – Карта плазмиды pGCSA

В плазмиде pGCSA транскрипция гена нуклеазы cas9 контролируется конститутивным промотором *gpdA* и терминатором *cbh1 P. verruculosum*. На 5'- и 3'-концах гена *cas9* расположены последовательности, кодирующие сайты внутриядерной локализации. Для транскрипции последовательности кодирующей sgRNA используется промотор 5S рРНК гриба *A. niger*. Последовательность AMA1 встроена для поддержания автономной транзientной репликации плазмиды в грибной клетке и предотвращения её интеграции в хромосомную ДНК гриба. На схеме показаны места посадки праймеров использованных для амплификации плазмиды pGCS и последовательность AMA1 при клонировании по методу Гибсона.

1.2.9 Формирование пула изолятов метанотрофных бактерий рода *Methylococcus*, способных к росту в широком диапазоне концентраций метанола. Отбор наиболее перспективного штамма-объекта для геномных модификаций, демонстрирующего высокую удельную скорость роста на метаноле и максимальную эффективность формирования колоний на агаризованных средах

#### ***Объекты и методология исследования***

В работе использовали четыре изолята метанотрофных бактерий рода *Methylococcus*, выделенные ранее из природных и антропогенных местообитаний с повышенной доступностью метана, штаммы IO1, KN2, ВН и Мс7, геномные последовательности которых были определены и проанализированы в предыдущем исследовании [38]. В целях расширения спектра штаммов, в рамках работы по настоящему проекту была проведена работа по получению дополнительных изолятов метанотрофов рода *Methylococcus*.

Для получения накопительных культур использовали образцы активного ила очистных сооружений г. Иркутск и покрывающей почвы полигона ТБО г. Ханты-Мансийск. Навеску ила или почвы (1 г) вносили во флаконы объемом 500 мл, добавляя 100 мл минеральной среды NMS 2:5 следующего состава (г л<sup>-1</sup>): KNO<sub>3</sub> – 0.2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.2; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0.04; 1 % (об./об.) 200 мМ фосфатного буфера (рН 6.4) и 0.1 % (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов следующего состава (г/л): ЭДТА – 5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 2, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.1, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0.03, CoCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O – 0.2, 10 CuCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0.1, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0.02, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 0.03. Метан вводили в газовую фазу флаконов до концентрации 30 об. %. Культивирование проводили на шейкере-инкубаторе Biosan ES-20/60 при 150 об/мин при температуре инкубации

42°C. Мониторинг роста метанотрофов в накопительных культурах осуществляли визуально и с использованием фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Zeiss AxioPlan 2 (Йена, Германия). Накопительные культуры, показавшие наиболее быстрый рост, отбирали и использовали для получения изолятов метанотрофов.

Выделение чистых культур метанотрофных бактерий проводили с использованием минеральной среды NMS 2:5 и следующих подходов: а) рассева разбавленной суспензии клеток на агаризованный вариант среды для получения колоний; б) многократных предельных разведений культуры в жидкой среде. В первом случае, осуществляли рассев суспензии накопительной культуры на среду NMS 2:5 с агар-агаром (1.5%), с последующей инкубацией в эксикаторах с 20-30% метана в газовой фазе в течение 5-10 дней при температуре в 42°C. Формирующиеся на средах колонии анализировали с использованием фазово-контрастной микроскопии. Колонии метанотрофов отбирали и многократно рассевали как на жидкой, так и на агаризованной средах. В случае использования серийных разведений, 0,5 мл суспензии клеток смешанной культуры последовательно разводили во флаконах общим объемом 60 мл с объемом среды 5 мл. Флаконы герметично закрывали, вводили метан шприцем с бактериальным фильтром 0,22 мкм до 30% CH<sub>4</sub> в газовой фазе и инкубировали на качалке (150 об/мин) при температуре в 42°C в течение 2-3 дней. Культуру, выросшую во флаконе с наибольшим разведением, анализировали с помощью фазово-контрастной микроскопии и подвергали последующему рассеvu. Процедуру повторяли до получения культуры, состоящей из морфологически одинаковых клеток.

Идентификацию полученных изолятов проводили путем анализа ПЦР-амплифицированных последовательностей генов 16S рРНК, секвенирование которых проводили на базе ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Определение способности формировать колонии на плотных средах с метанолом оценивали путем рассева суспензий клеток метанотрофов на агаризованную среду NMS 2:5, содержащую 0.5-1 об. % CH<sub>3</sub>OH. Чашки с посевами инкубировали в эксикаторе при температуре 42°C в течение 7-10 дней. Определение оптимума концентрации метанола и ростовых характеристик изолятов проводили при культивировании в жидкой среде NMS 2:5 во флаконах с концентрацией метанола от 0.05 до 4 об. % с инкубацией на шейкере (150 об./мин) при температуре 42°C. Рост оценивали путем регулярных измерений оптической плотности культуры на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer AG 22331 (Германия) при длине волны 600 нм.

***Идентификация новых изолятов и скрининг общего пула штаммов на способность к росту на метаноле***

В дополнение к ранее полученным культурам метанотрофных бактерий рода *Methylococcus*, штаммам IO1, KN2, ВН и Mc7, из активного ила очистных сооружений г. Иркутска и покрывающей почвы полигона ТБО г. Ханты-Мансийск были получены два новых изолята, штаммы MIR и ОК, соответственно. Анализ генов 16S рРНК новых изолятов подтвердил их принадлежность к роду *Methylococcus*. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма MIR была близка к таковым у штаммов IO1, KN2 и *M. capsulatus* Bath (99.93–99.97% сходства). Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма ОК была идентична таковой у штамма Mc7 и обнаруживала 98.56% сходства с таковой у *M. geothermalis* IM1<sup>T</sup>. Перечень исследованных в работе штаммов представлен в таблице 21.

Таблица 21 - Штаммы метанотрофных бактерий рода *Methylococcus*, исследованные в настоящей работе

Штамм	Источник выделения	Ближайший охарактеризованный представитель (% сходства генов 16S рРНК)	Формирование колоний на агаризованной среде с метанолом	Рост на жидкой среде с метанолом (диапазон концентраций)
IO1	Активный ил, Москва	<i>M. capsulatus</i> Bath (99.97)	+	0.05 – 0.1
KN2	Активный ил, Москва	<i>M. capsulatus</i> Bath (99.93)	+	0.05 – 4.0
MIR	Активный ил, Иркутск	<i>M. capsulatus</i> Bath (99.93)	+	0.05 – 3.5
ВН	Донные отложения безымянного озера, Краснодарский край	<i>M. capsulatus</i> Bath (99.02)	–	0.05 – 1.5
Mc7	Почва ТБО, Ханты-Мансийск	<i>M. geothermalis</i> IM1 <sup>T</sup> (98.56)	–	0.05 – 0.1
ОК	Почва ТБО, Ханты-Мансийск	<i>M. geothermalis</i> IM1 <sup>T</sup> (98.56)	–	0.05 – 3.0

Проверка исследуемых культур метанотрофов на способность формировать колонии на минеральной агаризованной среде с метанолом дала положительные результаты только для штаммов IO1, KN2 и MIR, таблица 21. Формирование колоний размером 1-4 мм наблюдалось после 7 суток инкубации. Морфология колоний, формируемых штаммом MIR на среде с метанолом, а также морфология клеток в этих колониях показаны на рисунке 27.

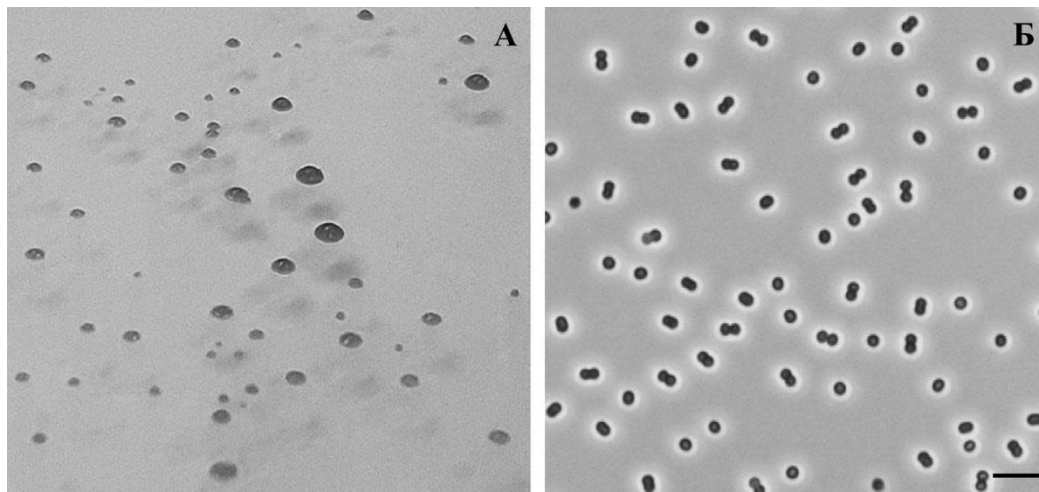


Рисунок 27 – Морфология колоний, формируемых штаммом MIR на минеральной среде с метанолом (А) и морфология клеток в этих колониях (Б); маркер, 5 мкм

Исследования способности штаммов к росту в жидких средах с метанолом показали, что диапазон концентраций  $\text{CH}_3\text{OH}$ , в которых наблюдается рост культур, также отличается у различных штаммов. Как указано в таблице 21, рост штаммов IO1 и Mc7 имел место только при низких концентрациях метанола (0.05 – 0.1 об%) и носил следовый характер ( $\text{OD}_{600}$  до 0.1). Наиболее стабильный рост в широком диапазоне концентраций метанола был отмечен для штаммов MIR, KN2 и ВН. Так как штамм ВН не формировал колонии при росте на агаризованных средах с метанолом, в качестве наиболее перспективных культур для дальнейших исследований были отобраны штаммы MIR и KN2. Они были способны к росту на метаноле в диапазоне концентраций 0.05-4 об.% с оптимумом при концентрации 1-2 об.%. Удельная скорость роста штаммов MIR и KN2 на метаноле варьировала в диапазоне 0.02-0.06 ч<sup>-1</sup>. В качестве целевого штамма дальнейших исследований, представленных в настоящем отчете,

был выбран штамм MIR. Штамму KN2 присвоен статус «резервного», привлечение которого для решения отдельных задач возможно на дальнейших этапах выполнения проекта.

#### 1.2.10 Проверка устойчивости целевого штамма метанотрофных бактерий к антибиотикам

Проведение генетических манипуляций с микроорганизмами зачастую предполагает наличие у целевого штамма некоего селективного маркера, например, устойчивости к антибиотикам. При этом, чтобы избежать ложноположительных результатов при отборе на селективных средах, следует убедиться в отсутствии резистентности штамма к используемым антибиотикам. Необходимым этапом проведения генетических манипуляций с метанотрофной культурой *Methylococcus capsulatus* MIR, таким образом, было определение у данного метанотрофа природной устойчивости к антибиотикам, потенциально применяемым в качестве селективных маркеров.

##### Методология исследования

Штамм MIR выращивали в колбах объёмом 750 мл со 100 мл среды «П» [110], закрытых резиновыми пробками, снабженными двумя короткими стеклянными трубками с ватными фильтрами. После внесения 5 мл инокулята колбы продували 1 л газовой смеси метан:воздух и встряхивали на роторной качалке при 180 об/мин в течение 24 ч при 42°C. Состав среды включал следующие компоненты (г/л): KNO<sub>3</sub> – 1; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,2; CaCl<sub>2</sub> – 0,02; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12H<sub>2</sub>O – 1,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,7 и 1 мл микроэлементов следующего состава (г/л): ЭДТА Na<sub>2</sub> – 5; FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 2; ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,1; MnCl<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O – 0,03; CuCl<sub>2</sub>×5H<sub>2</sub>O – 0,1; CoCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O – 0,2; NiCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O – 0,02; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 0,03; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,3. Далее суспензию выращенных в колбе клеток метанотрофа высевали на чашки с агаризованной средой «П», содержащей различные концентрации следующих антибиотиков: канамицин (Sigma-Aldrich, Германия) – 50, 100 и 150 мкг/мл; гентамицин (Дальхимфарм, Россия) – 10, 25 и 40 мкг/мл; спектиномицин (Sigma-Aldrich, Германия) – 100, 200 и 300 мкг/мл. В качестве положительного контроля использовали чашки без добавления антибиотиков. Чашки инкубировали при 42°C в эксикаторе, заполненном смесью метан-воздух (1:1) в течение 14 суток и анализировали на предмет появления устойчивых к исследуемым антибиотикам колоний.

##### ***Результаты проверки устойчивости целевого штамма к антибиотикам***

После 14 суток инкубации на всех чашках Петри с антибиотиками при всех исследуемых концентрациях колонии целевого штамма обнаружены не были, рисунок 28. Напротив, в

контрольных условиях, при отсутствии антибиотиков, колонии *Methylococcus capsulatus* MIR визуально обнаруживались после 5-7 суток культивирования, рисунок 28А.

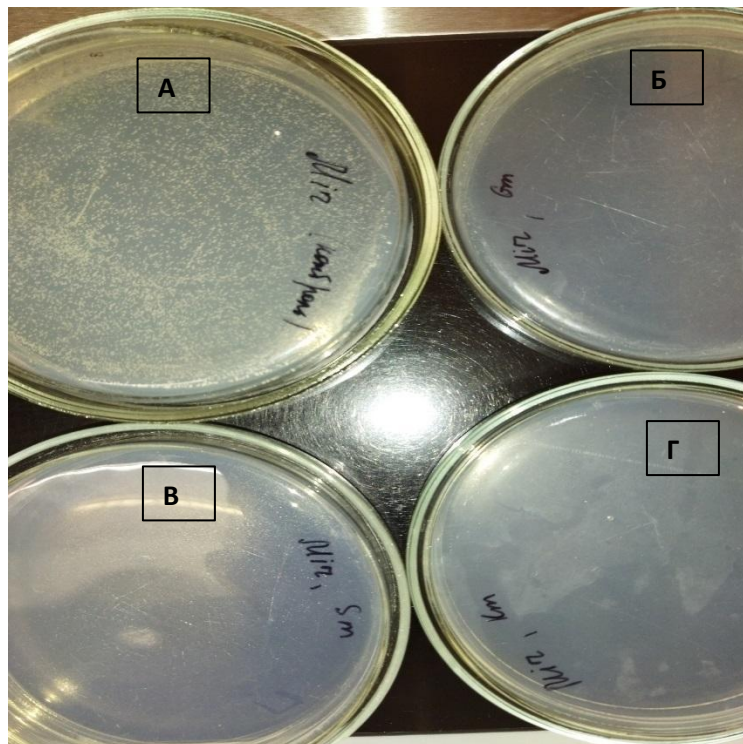


Рисунок 28 – Рост *Mc. capsulatus* MIR на агаризованной среде «П» без антибиотика (А), а также среде, содержащей 10 мкг/мл гентамицина (Б), 100 мкг/мл спектиномицина (В) или 50 мкг/мл канамицина (Г)

Таким образом, у метанотрофной бактерии *Methylococcus capsulatus* MIR отсутствует природная или спонтанно возникающая устойчивость к канамицину, гентамицину и спектиномицину. Канамицин, гентамицин и спектиномицин в концентрациях 50, 10 и 100 мкг/мл, соответственно, могут быть применимы в качестве селективных факторов отбора при генетических манипуляциях со штаммом *Methylococcus capsulatus* MIR.

В ходе проведенного исследования было показано отсутствие у *Methylococcus capsulatus* MIR природной или спонтанно возникающей устойчивости к канамицину, гентамицину и спектиномицину, что потенциально позволяет использовать гены устойчивости к данным антибиотикам при генетическом редактировании облигатного метанотрофа *Methylococcus*

*capsulatus* MIR. Канамицин, гентамицин и спектиномицин в качестве селективных факторов отбора должны быть применены в концентрациях 50, 10 и 100 мкг/мл, соответственно.

1.2.11 Анализ особенностей метаболизма целевого штамма метанотрофа на основе данных его полной геномной последовательности

### ***Методология анализа***

Секвенирование нуклеотидной последовательности генома штамма MIR было выполнено с использованием технологий Illumina Miseq и Oxford Nanopore. Гибридная сборка коротких и длинных прочтений была выполнена с помощью программы Unicycler. Аннотацию нуклеотидной последовательности генома выполняли с помощью программы Prokka [86]. Особенности метаболизма анализировали на основе результатов автоматической аннотации с дополнительной проверкой в ручном режиме с помощью базы данных NCBI и инструмента Blast, принимая 35% идентичности и 50% покрытия аминокислотной последовательности в качестве отсечки для установления предполагаемой функции рассматриваемой белок-кодирующей последовательности.

### ***Основные характеристики генома целевого штамма***

В результате секвенирования геномной последовательности штамма MIR было получено 1,87 млн. коротких прочтений со средней длиной 270 п.о. и 231 тыс. длинных прочтений со средней длиной 11777 п.о. Гибридная сборка позволила получить замкнутую геномную последовательность целевого штамма метанотрофа. Размер генома *Methylococcus capsulatus* MIR составил 3,2 млн п.о., среднее содержание пар Г+Ц 63,5%.

Анализ метаболизма штамма MIR на основе его геномной последовательности был выполнен в сравнении с ранее определенным геномом резервного штамма KN2 (номер доступа в ГенБанке CP079097.1) [38]. Как показано в таблице 22, геномы этих метанотрофов обнаруживают высокое сходство по содержанию пар Г+Ц, количеству оперонов, кодирующих рибосомальную РНК, мембранную и растворимую метанмонооксигеназы. Размер генома штамма MIR (3,2 млн п.о.) несколько превышает таковой у штамма KN2 (3,6 млн п.о.). Сходство полных нуклеотидных последовательностей геномов этих метанотрофов составило 98.86 %.



Таблица 22 – Основные характеристики геномов штаммов MIR и KN2

Характеристика	Штамм MIR	Штамм KN2
Размер генома (млн. п. о.)	3,2	3,6
Число контигов	1	1
Доля ГЦ (мол. %)	63,5	63,5
Открытые рамки считывания	2912	3289
рРНК (5S, 16S, 23S)	2; 2; 2	2; 2; 2
CRISPR	2	2
мММО оперон	2	2
рММО оперон	1	1
Сходство полных нуклеотидных последовательностей, %	98.86	

### ***Энергетический метаболизм и ферменты цепи окисления метана***

Штаммы MIR и KN2 обладают как растворимой, так и мембранной метанмонооксигеназами (рММО и мММО, соответственно), которые обеспечивают первичное окисление метана до метанола. Геном каждого штамма содержит две копии кластера *pmoCAB*, кодирующего мММО, и дополнительную копию *pmoC* (*pmoC3*). Аминокислотные последовательности PmoA штаммов MIR и KN2 демонстрируют полную идентичность. Компоненты рММО кодируются кластером генов *mmoXYBZDC*, последовательности MmoX штаммов также демонстрируют максимальный уровень гомологии. Оба генома содержат кластер генов *mmoGQSR*, кодирующий большую субъединицу шаперонина GroEL (*mmoG*), двухкомпонентную сенсорную/регуляторную систему (*mmoQ* и *mmoS*) и активатор транскрипции (*mmoR*).

Окисление метанола осуществляется пирролохинолинхинон-зависимой метанолдегидрогеназой (МДГ), катализирующей вторую стадию окисления одноуглеродного субстрата. В геномах штаммов MIR и KN2 присутствуют идентично организованные кластеры генов *mxaFJGIRACKLD*, кодирующих компоненты гетеродимерной Ca<sup>2+</sup>-зависимой метанолдегидрогеназы (MxaFI) и белки, требуемые для ее каталитической активности. В дополнение к генам *mxaFI*, кодирующим большую и малую субъединицы метанолдегидрогеназы, этот кластер содержит ген цитохрома c<sub>L</sub> (*mxaG*) и гены белков,

необходимых для включения  $\text{Ca}^{2+}$  в активный центр фермента (*mxaACKL*), а также два белка с неизвестными функциями (*mxaRS*). Ген *хоxF*, кодирующий дивергентную МДГ, в активном центре которой вместо кальция содержится редкоземельный элемент [68], и ген *хоxG*, кодирующий специфический акцептор электронов, отдельно расположены на хромосомах двух штаммов [109].

Последовательное окисление формальдегида осуществляется ферментами метаболического пути с участием тетрагидрофолата (ТГФ). По этому пути N5, N10-метилен-ТГФ образуется в результате спонтанной конденсации  $\text{CH}_2\text{O}$  с ТГФ, в которой участвует метилен-ТГФ-дегидрогеназа, а затем окисляется до N5, N10-метенил-ТГФ. Затем последовательно с участием ферментов метенил-ТГФ-циклогидролазы и формил-ТГФ-циклолигазы N5,N10-метенил-ТГФ превращается в свободный формиат. На уровне метенил-ТГФ и/или формил-ТГФ C1-субстрат поступает в сериновый цикл ассимиляции углерода. У штаммов MIR и KN2 обнаружены все генетические детерминанты тетрагидрофолатного пути, а также полный набор генов, кодирующих ферменты тетрагидрометаноптерин (ТГМП)-зависимого пути окисления формальдегида до  $\text{CO}_2$ , включая метилен-ТГМП-дегидрогеназу, метенил-ТГМП-циклогидролазу, формилметанофуранформилтрансферазу и формилметанофуран дегидрогеназу. Оба штамма имеют гены трехсубъединичной формиатдегидрогеназы, которая катализирует окисление метана до  $\text{CO}_2$ . Геномы штаммов также содержат все пять генов оперона, кодирующего формиатдегидрогеназу, которая гомологична цитоплазматической  $\text{НАД}^+$ -зависимой формиатдегидрогеназе, катализирующей обратимую реакцию окисления формиата до  $\text{CO}_2$  [48]. Помимо структурных белков фермента, этот оперон кодирует полипептиды FdsC и FdsD, участвующие в модификации кофактора молибдена и его включение в структуру фермента. В геномах также присутствует двухсубъединичная формиатдегидрогеназа. Штамм KN2 обладает односубъединичной формиатдегидрогеназой, которая отсутствует у штамма MIR.

Окисление формальдегида до  $\text{CO}_2$  может дополнительно происходить с участием компонентов рибулозомонофосфатного (РМФ) пути. В окислительном цикле РМФ пути формальдегид реагирует с рибулозо-5-фосфатом с образованием гексулозо-6-фосфата, который затем изомеризуется во фруктозо-6-фосфат, а затем в глюкозо-6-фосфат. Геномы штаммов MIR и KN2 кодируют две изоформы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и одну 6-фосфоглюконатдегидрогеназу/декарбоксилазу, которые продуцируют молекулу  $\text{CO}_2$  и восстанавливают  $\text{НАД}(\text{Ф})^+$ , таким образом регенерируя рибулозо-5-фосфат.

### ***Конструктивный метаболизм и пути ассимиляции углерода***

В геноме штамма MIR содержатся по две копии генов, кодирующих основные ферменты рибулозомонофосфатного (РМФ) пути: гексулозофосфатсинтазу, гексулозофосфатизомеразу, фруктозобисфосфатальдолазу и транскетолазу. Гены ферментов РМФ цикла линейно дублированы. Геном штамма KN2 содержит по одной копии каждого из этих генов, однако в нем обнаружены редуцированные аминокислотные последовательности, аннотированные как фруктозобисфосфатальдолаза и транскетолаза.

Геномы обоих штаммов содержат гены, кодирующие ферменты серинового пути, по которому также может происходить ассимиляция формальдегида. Они обладают кластером *sga-hpr-gck3*, кодирующим серин-глиоксилат аминотрансферазу, гидроксипируватредуктазу и 3-глицераткиназу. Они также имеют генетические детерминанты ферментов малил-КоА-лиазы и малаттиокиназы, участвующие в синтезе глиоксилата. Это соединение является предшественником глицина, который служит акцептором С1-соединений, таких как метенил-ТГФ и/или формил-ТГФ, с образованием серина. Однако для полного функционирования цикла не хватает фосфоенолпируваткарбоксилазы - важного фермента серинового пути. Ген пирогликоксилазы также не был обнаружен в исследуемых геномах *Methylococcus*.

Анализ ферментов цикла Кальвина показал, что оба штамма *Methylococcus* обладают генами *cbbL* и *cbbS*, кодирующими большую и малую субъединицы Рубиско, а также ген *cbbQ*, кодирующий полипептид, который предположительно действует как посттрансляционный активатор Рубиско. Как и в других представителях *Proteobacteria*, данный фермент у обоих штаммов относится к “зеленому” типу Рубиско (clade A) [101].

### ***Центральный метаболизм***

Геномы штаммов MIR и KN2 кодируют несколько путей деградации фосфорилированных С6-сахаров: модифицированный путь Эмбдена-Мейерхофа-Парнаса, где реакция синтеза фруктозо-1,6-фосфата из фруктозо-6-фосфата катализируется с помощью пирогликоксилазы, путь Энтнера-Дудорова и фосфокетотазный путь. Фосфогликоксилаза, катализирующая обратимую реакцию, компенсирует отсутствие фруктозобисфосфатазы, как это было показано ранее на примере *Ms. capsulatus* Bath [17]. Геномы также содержат все ферменты пути Энтнера-Дудорова для превращения фруктозо-6-фосфата в глицеральдегид-3-фосфат и пируват: глюкозо-6-фосфат-изомеразу, глюкозо-6-

фосфатдегидрогеназу, 6-фосфоглюконолактоназу, 6-фосфоглюконатдегидратазу и 2-кето-3-дезоксиглюко-6-фосфоглюконатальдозу. Штаммы также обладают генетическими детерминантами альтернативного пути деградации сахара, включающего фосфокетолазу, катализирующую расщепление фруктозо-6-фосфата и/или ксилулозо-5-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат/эритрозо-4-фосфат и ацетилфосфат; ацетаткиназа далее превращает ацетилфосфат в ацетат и продуцирует АТФ [49]. Гены, кодирующие ацетил-КоА-синтетазу, которая катализирует синтез ацетил-КоА, сопровождающийся разложением АТФ до АМФ, присутствуют в обоих геномах.

Пути метаболизма азота, кодируемые в геномах штаммов MIR и KN2, также были проанализированы. Гены, кодирующие классическую Mo-Fe нитрогеназу, были идентифицированы в геномах обоих штаммов. Кластеры генов, кодирующих редкие V-Fe нитрогеназы, не были обнаружены. Оба штаммы способны использовать нитрат в качестве источника азота, что обусловлено наличием генов, кодирующих белок-переносчик нитрата и ферменты ассимиляционной нитратредукции: нитратредуктазу (*nasAB*) и нитритредуктазу (*nirBD*). Переносчики иона аммония также были обнаружены в обоих геномах наряду с ферментами глутамин синтетазой (*glnA*) и глутамат синтазой (*gltB*), требуемыми для превращения аммония в L-глутамат. Оба штамма располагают генами гидроксиламиндегидрогеназы (*hao*), которая катализирует окисление гидроксилamina в NO. Гидроксиламин может образовываться в клетке за счет неспецифического окисления аммония метанмонооксигеназой, поскольку аммониймонооксигеназа (Amo) отсутствует в геномах исследуемых штаммов. Кластер *norBC*, обуславливающий способность восстановления оксида азота в закись азота, присутствует в обоих геномах.

### ***Синтез запасных соединений***

Геномы штаммов MIR и KN2 кодируют ферменты, необходимые для синтеза гликогена: 4- $\alpha$ -глюканотрансферазу, глюкозо-1-фосфатаденилилтрансферазу, 1,4- $\alpha$ -глюкан-ветвящийся фермент GlgB, гликогенсинтазу. Гены этих ферментов собраны в один кластер. Вдобавок был обнаружен дополнительный кластер генов, который кодирует гликогенсинтазу 2 и  $\alpha$ -амилазу. Две гликогенсинтазы представляют потенциально перспективные мишени для геномной модификации, чтобы предотвратить потерю углерода на синтез запасных углеводных соединений и увеличить относительное содержание белка в клетках метанотрофа-продуцента.

Выполненный анализ позволил составить детальную картину путей первичного и промежуточного метаболизма целевого метанотрофа, что дает основу для определения возможностей оптимизации характеристик штамма с помощью метаболической инженерии.

1.2.12 Проверка доступных векторов для подбора маркеров антибиотикоустойчивости для работы с целевым штаммом метанотрофа

В метаболической инженерии воспроизводимые (реплицируемые, поддерживаемые) плазмиды являются ценными генно-инженерными инструментами, которые можно использовать для гомо- или гетерологичной экспрессии исследуемых белков, а также для быстрого тестирования создаваемых генетических конструкций на предмет их функциональности в клетках реципиента. Известно, что в метанотрофных бактериях успешно поддерживаются репликоны широкого круга хозяев RP4/RK2 (IncP) [8], а также репликоны RSF1010 (IncQ) [51] и pBBR1 [106]. На этапе исследований 2021 года были протестированы плазмиды, которые могли бы быть использованы в работе с *Mc. capsulatus* MIR.

#### **Методология исследования**

Для метаболической инженерии *Mc. capsulatus* MIR в качестве потенциальных инструментов были протестированы три IncP-основанные плазмиды pAWP78, pSB2 и pSB3, несущие гены устойчивости к антибиотикам - канамицину (pAWP78), гентамицину (pSB2), спектиномицину (pSB3), соответственно.

Вектор pAWP78 [44] представляет собой уменьшенную версию плазмиды pCM66 с удаленными генами устойчивости к ампициллину и тетрациклину и содержит ген устойчивости к канамицину, рисунок 29. Вектор pSB2 является производной плазмиды pMHA200 [8], где ген устойчивости к канамицину был нами ранее заменен на гентамициновую кассету, рисунок 30. Плазида pSB3, рисунок 31 является производной экспрессионного вектора pCAN01 [12] и была ранее нами получена путем замены в pCAN01 гена устойчивости к канамицину на спектиномициновую кассету, источником которой служила плазида pCAN01CasSp [96].

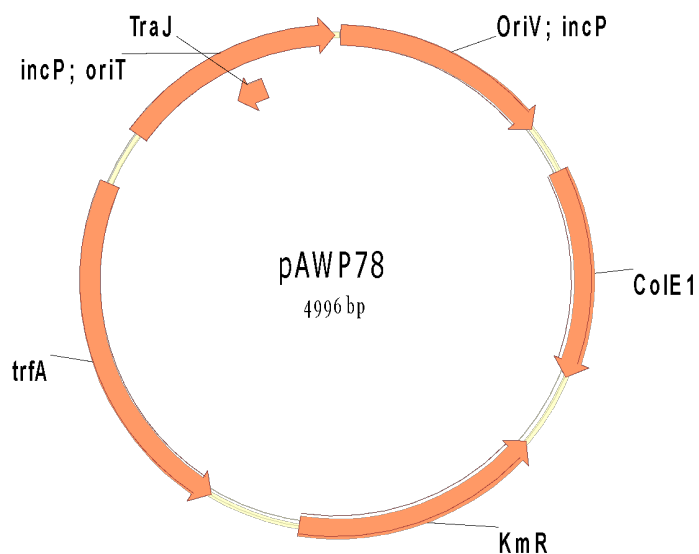


Рисунок 29 – Карта вектора широкого круга хозяев pAWP78. KmR – ген устойчивости к канамицину, trfA – ген белка инициации репликации oriV, oriV – ориджин репликации/переноса на основе IncP, ColE1 ori - ориджин репликации *E. coli* с высокой копией. Карта плазмиды была создана с помощью Vector NTI 9

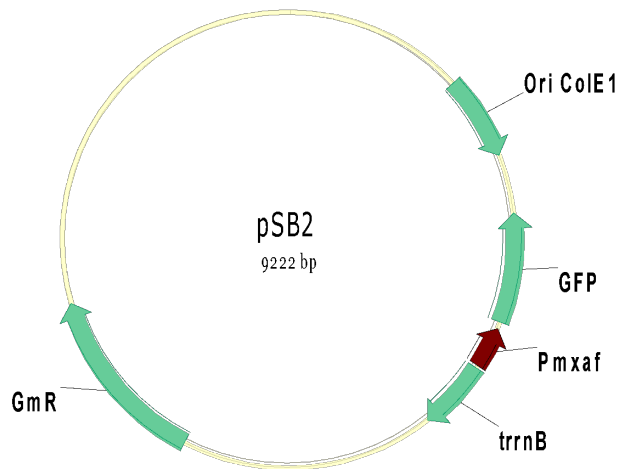


Рисунок 30 – Карта вектора широкого круга хозяев pSB2. ColE1 ori - ориджин репликации *E. coli*; GmR – ген устойчивости к гентамицину; Pmxaf – предполагаемый промотор большой субъединицы метанолдегидрогеназы; GFP – ген, кодирующий зелёный флуоресцентный белок, trnB - терминатор транскрипции. Карта плазмиды была создана с помощью программы Vector NTI 9

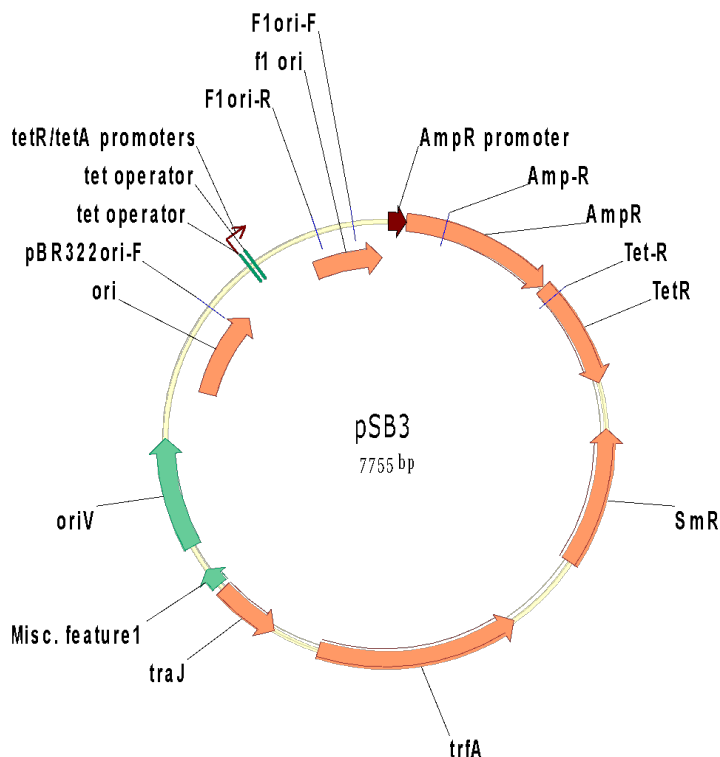


Рисунок 31 – Карта вектора широкого круга хозяев pSB3. SmR – ген устойчивости к спектиномицину, ApR – ген бета-лактамазы, tetR – транскрипционно слитый тетрациклиновый репрессор, trfA – ген белка инициации репликации oriV, oriV – ориджин репликации/переноса на основе IncP, pBR322 ori - ориджин репликации *E. coli*. Карта плазмиды была создана с помощью программы Vector NTI 9

Клетки облигатного метанотрофа *Ms. capsulatus* MIR выращивали в атмосфере метан-воздух (1:1) в течение 3 суток при 42°C на чашках с агаризованной средой «П» [110], содержащей (г/л): KNO<sub>3</sub> – 1; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,2; CaCl<sub>2</sub> – 0,02; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12H<sub>2</sub>O – 1,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,7 и 1 мл микроэлементов следующего состава (г/л): ЭДТА-Na<sub>2</sub> – 5; FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 2; ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,1; MnCl<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O – 0,03; CuCl<sub>2</sub>×5H<sub>2</sub>O – 0,1; CoCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O – 0,2; NiCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O – 0,02; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 0,03; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,3; агар – 1,8. Среду стерилизовали при 1 атм. в течение 30 мин. Фосфаты готовили и стерилизовали отдельно, добавляя их в среду перед засевом. Клетки конъюгативного штамма *Escherichia coli* S17-1 трансформировали векторами с широким кругом хозяев, несущими гены устойчивости к канамицину (плазмида pAWP78), гентамицину (плазмида pSB2), спектиномицину (плазмида pSB3) и высевали на селективную агаризованную

среду LB [15]с добавлением канамицина (50 мкг/мл), гентамицина (4 мкг/мл) или спектиномицина (100 мкг/мл), соответственно. Клетки донорных штаммов *E. coli* S17-1, несущих исследуемые плазмиды pAWP78, pSB2 и pSB3 перед конъюгацией наращивали в тех же условиях в течение ночи. Конъюгацию клеток донорного штамма *E. coli* S17-1, несущего соответствующую плазмиду, и клеток метанотрофа проводили на чашках с агаризованной средой «П», содержащей 3% (об/об) среды LB. Чашки инкубировали при 37°C в атмосфере метан-воздух (1:1) в течение 2 суток. Далее, смесь клеток *E. coli* и метанотрофа пересеивали на чашки с агаризованной средой «П», содержащей соответствующий антибиотик. При переносе в клетки метанотрофа плазмиды pAWP78, в среду добавляли канамицин в концентрации 50 мкг/мл, при переносе плазмиды pSB2 - гентамицин (10 мкг/мл) или, в случае плазмиды pSB3 - спектиномицин (100 мкг/мл). Чашки инкубировали при 42°C в атмосфере метан-воздух (1:1) до появления колоний (5-7 суток). Для увеличения количества биомассы, выросшие единичные колонии метанотрофа пересеивали на чашки с агаризованной средой «П» и инкубировали, как описано выше, в течение 3-4 суток.

Выделение тотальной ДНК из устойчивых к антибиотикам клеток метанотрофа осуществляли модифицированным методом [61]. Для этого ~50 мг биомассы суспендировали в 100 мкл TE-буфера, добавляли 2-3 мг лизоцима и инкубировали 30 мин при 37°C. Далее к суспензии клеток добавляли 5 мкл 10%-го раствора додецилсульфата натрия и инкубировали 15 мин при 65°C, затем добавляли 20 мкл 5М NaCl и 15 мкл 10% раствора цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) в 0,7 М NaCl, перемешивали и снова инкубировали 15 мин при 65°C. Полученный раствор обрабатывали смесью фенол-хлороформ (1:1) и центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Верхнюю водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 250 мкл изопропанола, выдерживали при комнатной температуре 15-30 мин и центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок промывали 80%-м этанолом, высушивали и растворяли в 10 мкл TE-буфера. Полученные образцы, содержащие тотальную ДНК, использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР со специфическими к исследуемой плазмиде праймерами, таблица 23, комплементарными генам антибиотикоустойчивости. Объем ПЦР смеси составлял 30 мкл и имел следующий состав: 1х ПЦР-буфер для Taq-ДНК-полимеразы, по 150 мкМ каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (Евроген, Россия), по 200 нМ прямого и обратного праймеров, 100 нг геномной ДНК, 1Е Taq-ДНК-полимеразы (Евроген, Россия). Использовали следующий температурно-временной профиль: первый цикл – 96°C × 3 мин, последующие 30



циклов - 94°C × 15 сек, 58°C × 15сек, 72°C × 1 мин 45с, окончательная полимеризация 72°C × 4 мин.

Таблица 23 – Праймеры, использованные для тестирования генов устойчивости к канамицину, гентамицину и спектиномицину в полученных рекомбинантных штаммах *Methylococcus capsulatus* MIR

Праймер	Последовательность (5`-3`)	Мишень
Gm-F	GCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGAG	Gm <sup>r</sup> -кассета вектора pSB2
Gm-R	CTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGC	
Sp-F	CATCATGAACAATAAACTGTCTGC	Sp <sup>r</sup> -кассета вектора pSB3
Sp-R	GCAGCATAACCTTTTTCCGT	
Km-F	CGCGCTCTACGAACTGCCGAT	Km <sup>r</sup> -кассета вектора pAWP78
Km-R	TCCGACTCGTCCAACATCAATACAA	

### **Результаты проверки векторов**

В результате проведенной работы методом конъюгативного переноса с использованием штамма *E. coli* S17-1 в качестве донорного были получены рекомбинантные штаммы метанотрофа *Methylococcus capsulatus* MIR, устойчивые к канамицину, гентамицину и спектиномицину, несущие челночные плазмиды pAWP78, pSB2 и pSB3, соответственно. Обнаружение устойчивости целевого штамма метанотрофа к антибиотикам и выявление у полученных рекомбинантных штаммов генов устойчивости к соответствующим антибиотикам методом ПЦР свидетельствуют о функциональности использованных генов антибиотикоустойчивости и их промоторов в клетках метанотрофа *Methylococcus capsulatus* MIR.

1.2.13 Проведение аналитического обзора литературы для выявления описанных в литературе особенностей использования CRISPR/Cas9 систем в различных видах дрожжей

В силу того, что одним из основных инструментов геномного редактирования, который планировалось применять в работе - это CRISPR/Cas, был проведен аналитический обзор

опубликованного материала по особенностям применения этого подхода в дрожжах и некоторых других объектах промышленной микробиологии.

#### 1.2.13.1 Происхождение и устройство системы CRISPR/Cas

Технология CRISPR/Cas, позволяющая адресно разрезать и модифицировать ДНК революционизировала редактирование геномов, облегчила его и добавила новых возможностей [108]. Эта технология происходит из механизма адаптивного иммунного ответа архей и бактерий [55]. Геномные последовательности CRISPR были впервые обнаружены в геноме *E. coli* Ishino и соавт. [74], как повторяющиеся палиндромы, разделенные небольшими, одинаковыми по размеру и уникальными спейсерами. В 2002 году было показано, что последовательности CRISPR транскрибируются в CRISPR РНК (crRNA), и было предсказано, что гены Cas, связанные с ними, обладают нуклеазной и геликазной активностью [54]. К 2005 году было установлено, что спейсерные последовательности заимствованы у вирусов [57]. В 2007 году было показано, что иммунный ответ CRISPR/Cas защищает *Streptococcus thermophilus* от вторжения вирусов [29]. Сейчас известны различные типы CRISPR-Cas, но наиболее широко используемой для редактирования гетерологичных генов является система CRISPR типа II.

В системе CRISPR/Cas9 эффектор (Cas9) активируется и нацеливается на определенные геномные локусы, образуя комплекс с CRISPR РНК (crRNA) и транскрибирующей crRNA (tracrRNA), которые часто объединяют в единую направляющую РНК (gRNA) [4; 27]. Наиболее широко используемый Cas9, полученный из *Streptococcus pyogenes*, распознает 20-нуклеотидную последовательность ДНК (мишень или протоспейсер), сразу за которой следует 5'-NGG-3' мотив (PAM).

В стандартной процедуре редактирования в клетку вводят плазмиду, кодирующую gRNA и Cas9, а также линейный фрагмент ДНК, содержащий требуемую замену. Геномная ДНК разрезается в желаемом месте Cas9, а затем разрез репарируется путем гомологичной рекомбинации с фрагментом измененной ДНК.

Применение технологии Crispr никак не ограничено организмом. Тем не менее, адаптируя имеющиеся конструкции Crispr-Cas к новому организму, следует обеспечить, чтобы в нем адекватно работали: а) плазмидный репликатор и б) промоторы Cas и gRNA. Также полезно, чтобы использование кодонов в гене Cas не слишком отличалось от предпочитаемого в данном организме.

### *1.2.13.2 Мультиплексная модификация генома дрожжей*

При генетической модификации дрожжей достаточно часто требуется произвести не одно, а несколько изменений в разных генах. Такие изменения можно производить последовательно, изменяя по одному гену за раз, но такой подход займет много времени. В целом, существует три распространенных подхода к экспрессии кассет генов для мультиплексного редактирования генов: (i) экспрессия множества gRNA в одной кассете gRNA с механизмами расщепления РНК; (ii) экспрессия множества gRNAs в нескольких кассетах gRNA; и (iii) редактирование множества predetermined последовательностей в геноме с помощью одной gRNA. Поэтому было разработано несколько технологий для одновременного изменения нескольких генов.

Первая демонстрация мультиплексного редактирования генома у дрожжей была произведена Райаном и др. с использованием плазмиды, содержащей кассету с экспрессией Cas9 и кассету с gRNA, содержащую саморасщепляющийся рибозим вируса гепатита дельта (HDV), прикрепленный к 5'-концу каждой gRNA (Ryan et al., 2014). Рибозим HDV расщепляет на 5'-конце своей последовательности. Дополнительные нуклеотиды из рибозима HDV, прикрепленные к gRNA не влияют на эффективность редактирования генома, и, что интересно, gRNA, модифицированные рибозимом HDV, значительно повысили эффективность редактирования генома (Ryan et al., 2014). Эта система может модифицировать максимум три локуса одновременно, используя донорскую ДНК длиной 120 п.н. с эффективностью около 20 и 80% у диплоидных и гаплоидных дрожжей соответственно [87].

Система гомологичной интеграции CRISPR (HI-CRISPR) разделяла экспрессию tracrRNA и crRNA, а не объединяла их в одну gRNA [52]. Кассеты Cas9, tracrRNA и crRNA (включая 20 нт последовательность спейсеров) экспрессировали в одной плазмиде. Кассета crRNA содержала множество crRNA, каждая из которых была окружена последовательностями прямых повторов, которые имитировали естественные прямые повторы массива *S. pyogenes* CRISPR. После транскрипции эти повторы были расщеплены эндогенной дрожжевой РНКазой III и неизвестными нуклеазами, что привело к экспрессии множества crRNA из одной кассеты. Это исследование успешно разрушило до трех различных локусов за одну трансформацию с использованием донорской ДНК длиной 100 п.н. с эффективностью, варьирующейся от 30 до 85%, в зависимости от целевых локусов.

В случаях, когда необходимо интегрировать в геном много копий одной и той же генной кассеты, для интеграции выбирают какие-нибудь элементы, имеющие несколько копий в

геноме. Одним из таких является дельта элемент *Tu* транспозонов. В геноме дрожжей имеется примерно около 40 дельта элементов. Ши и др. разработали систему CRISPR/Cas9 для нацеливания на эти  $\delta$ -сайты, называемую CRISPR на основе дельта-интеграции (Di-CRISPR; [3]). Используя этот подход, авторы смогли интегрировать до 18 копий кассеты объемом 24 кб в  $\delta$  сайты. Эта 24 кб кассета донорской ДНК содержала семь генов: три гена утилизации ксилозы, три гена биосинтеза (R,R)-2,3-бутандиенола (BDO) и репортерный ген GFP. Полученный штамм может использовать ксилозу в качестве единственного источника углерода и производить BDO (Shi et al., 2016). Другая эндогенная последовательность, рибосомная ДНК (рДНК), также использовалась в качестве мишени для многокопийной интеграции генов (Ван и др., 2018). рДНК расположена в локусе RDN1, который представляет собой участок размером 1-2 Мб в хромосоме XII дрожжей и содержит 100-200 копий повтора размером 9,1 кб. Каждый повтор имеет области, которые кодируют рРНК, и некодирующие области. Ван и др. нацелились на одну из некодирующих областей, называемых нетранскрибируемыми спейсерами 1 (NTS1) для своей системы [31]. Хотя было показано, что разрезание в нескольких точках одной хромосомы могут привести к нарушению стабильности генома и снизить эффективность системы CRISPR/Cas9 в (Jessop-Fabre et al., 2016), авторам удалось добиться успешной интеграции до 10 копий ДНК кассеты с 45% эффективностью, и полученный штамм сохранял стабильную численность копий после 55 поколений [31].

Помимо Cas9, для редактирования генома набирает популярность Cas12a. Между Cas9 и Cas12a есть три важных различия: (i) Cas12a распознает последовательность 5'-(T)TTV-3' PAM, и она расщепляет последовательности ниже по потоку от PAM, а не выше по потоку, как Cas9; (ii) Cas12a нужна только crRNA для функционирования в качестве эндонуклеазы, вместо crRNA и tracrRNA, используемых Cas9; (iii) Cas12a обладает способностью обрабатывать пре-crRNA, тогда как Cas9 требует активности РНКазы хозяина для этого. Таким образом, Cas12a обладает огромным потенциалом для использования в эффективной мультиплексной системе редактирования генома.

### *1.2.13.3 Регуляция экспрессии генов на основе CRISPR/Cas9*

Система CRISPR/Cas9 может быть использована не только для изменения генома, но и для регуляции экспрессии генов, хотя это направление пока менее развито. Для репрессии генов на основе CRISPR/Cas9 (CRISPR interference - CRISPRi) обычно используют деактивированный Cas9 (dCas9), полученный путем мутации доменов нуклеазы Cas9 [84]. dCas9 плотно связывается с целевыми сайтами в промоторах генов, что подавляет экспрессию этих генов стерически препятствуя связыванию РНК-полимеразы. Эффективность репрессии может быть повышена путем слияния dCas9 с различными доменами-репрессорами транскрипции [24]. Мультиплексный CRISPRi в дрожжах был успешно использован, для одновременной репрессии семи генов дрожжей с целью увеличения выработки  $\beta$ -амирина. Уровень репрессии каждого из семи генов составил от 60 до 80% [91]. Механизм CRISPR/dCas9 может быть использован и для повышения экспрессии генов. Для этого используют dCas9 слитый с доменами, активирующими транскрипцию, такими как VP64, P65AD или Rta [41].

### *1.2.13.4 Введение точечных мутаций*

Введение точечных мутаций системой CRISPR/Cas является более сложной задачей, чем делеции или инсерции. Акт мутагенеза должен изменять мишень CRISPR/Cas, причем оказывается, что замена одного нуклеотида в мишени часто неспособна предотвратить повторное разрезание того же сайта. Так, Mans и соавт. смогли внести точечную замену этим методом, причем замена сопровождалась уничтожением сайта рестрикции, что позволяло выявлять позитивные клоны. Секвенирование нескольких позитивных клонов показало, что некоторые из них содержат дополнительные незапланированные мутации, возникшие, вероятно в результате многократного разрезания Cas9 [27]. Поэтому была предложена двухэтапная схема: сначала 20-нуклеотидную мишень заменяют на случайный, но существенно непохожий фрагмент, а затем уже его заменяют на желаемую последовательность с единственной заменой. Несмотря на то, что количество этапов увеличивается, такая схема оказывается более эффективной, поскольку с одноэтапном варианте а) сильно затруднено выявление правильных клонов с помощью ПЦР и их выход снижен и б) возникают незапланированные нуклеотидные замены [13].

Модифицированные gRNA могут эффективно снижать нецелевую активность за счет, как это ни парадоксально, добавления двух дополнительных гуаниновых нуклеотидов к 5'- концу (GG-N20-NGG) традиционной конструкции gRNA ((GN19NGG), или использование укороченных gRNAs (GN17-NGG или GN18-NGG).

#### 1.2.13.5 Использование CRISPR/Cas для генной инженерии дрожжей

Используя разработанную ранее систему CRISPR/Cas9 для *P. pastoris* [26] удалось ввести гены ферментов цикла Кальвина в *P. pastoris*. Таким образом, удалось получить метанол-индуцированного автотрофа на основе *P. pastoris* [98]. Так же возможно регулировать уровень транскрипции РНК при помощи CRISPR-ассоциированного РНК регулятора. Система только разрабатывается, однако уже показала хорошие результаты при регуляции уровня экспрессии гена *RIB1* под pGAP промотором [43].

Kruasuwan и соавторы разработали мультиплексную систему CRISPR-dCas9, которая позволяет одновременно активировать несколько генов у дрожжей *Ogataea thermomethanolica*. Используя эту систему, они показали возможность инактивации до четырех генов (*SOD1*, *VPS1*, *YPT7* и *YPT35*) в одном раунде редактирования с помощью CRISPR/Cas9. В результате удалось увеличить секрецию грибковой ксиланазы и фитазы до 29% и 41% соответственно [70].

Фактором, осложняющим модификацию генома промышленных дрожжей является то, что они диплоидны или имеют более высокую ploидность, и, значит, требуется надежно модифицировать несколько копий каждого гена. Lian и соавторы обнаружили, что это требует повышенной экспрессии gRNA. Они также показали, что стандартные плазмиды с геном устойчивости к антибиотику G418 и двумикронным репликатором имеют сравнительно низкую копияность – примерно 5 копий на клетку. Чтобы увеличить копияность, они ослабили промотор гена устойчивости, что привело к увеличению копияности плазмиды до примерно 80. Это позволило разрушить за одну трансформацию четыре гена, *ALD6*, *PHO13*, *LEU2* и *URA3* в двух диплоидных и одном триплоидном штамме с эффективностью 100%. В полученные штаммы далее вводили путь утилизации ксилозы и биосинтеза лактата на плаزمидях с ауксотрофными маркерами для создания промышленных штаммов дрожжей, продуцирующих лактат [35].

Галофильные и осмоотолерантные дрожжи *Debaryomyces hansenii* имеют высокий биотехнологический потенциал благодаря своей устойчивости к неблагоприятным природным условиям и совместимости с широким спектром субстратов. Однако на пути использования этих дрожжей есть препятствия: скудный набор молекулярно-генетических инструментов для *D. hansenii*, высокий уровень негомологичной рекомбинации и использование CUG кодона для кодирования серина, а не лейцина. Strucko и соавторы разработали высокоэффективный набор инструментов генной инженерии CRISPR<sup>CUG</sup>/Cas9 для *D. hansenii*, который применим даже к прототрофным штаммам. Также авторы нарушили механизм негомологичной рекомбинации,

чтобы обеспечить точное Cas9-опосредованное введение точечных мутаций и безмаркерных делеций генов с помощью гомологичной рекомбинации. Наконец, они показали, что одноцепочечных олигонуклеотидов длиной 90 п.о. достаточно, чтобы опосредовать репарацию вызванных Cas9 двухцепочечных разрывов, тем самым значительно сокращая время и стоимость редактирования генома *D. Hansenii* [2].

В производстве вина в результате спонтанной реакции между мочевиной и этанолом может образовываться этилкарбамат являющийся потенциальным канцерогеном для человека. Дрожжи могут производить мочевины из аргинина и секретировать ее. Чтобы избежать появления этилкарбамата, Vigentini и соавторы делетировали аргинин-пермеазу *CAN1* в двух коммерческих штаммах *S. cerevisiae* (EC1118, AWRI796) используя CRISPR/Cas9. Делеция не повлияла на скорость ферментации, но вино, полученное с помощью модифицированных штаммов, не содержало мочевины, в отличие от исходных штаммов [28].

1.2.14 Создание и фенотипический анализ штамма с делецией гена MET8 с целью характеристики этой модификации в качестве ауксотрофного маркера в *Ogataea polymorpha*

Ранее нами было обнаружено, что спонтанная мутация гена *MET8* вызывает накопление флуоресцентных порфиринов в клетках дрожжей *Ogataea polymorpha*. В ходе данного этапа работы была проведена направленная делеция гена MET8 в дрожжах.

Для этого была использована плаزمида pAM898-10 из геномной библиотеки, процедура получения которой описана в [71]. Плазмиды, содержащая ген MET8, была выделена в ходе комплементации фенотипа накопления порфирина. Далее на основе этой плазмиды был получен делеционный аллель гена. Для этого фрагмент длиной 4654 пн (*HindIII-Ecl136II*) был субклонирован между *HindIII-Ecl136II* сайтами вектора pTZ18 из которого был заранее удален сайт *EcoRI*. Далее из этой плазмиды был удален фрагмент *Bsp1407-EcoRI*. Полученная плазмиды была обработана рестриктазой *MunI* и была использована для трансформации штамма дрожжей *O. polymorpha* (совместно с автономным вектором для котрансформации p2CLX4), после чего полученные трансформанты проверяли на предмет флуоресценции, характерной для порфиринов (красное свечение при возбуждении светодиодом с максимумом интенсивности в области 405 нм), рисунок 32. См. Протокол получения трансформантов и исследования флуоресценции в приложении Б.

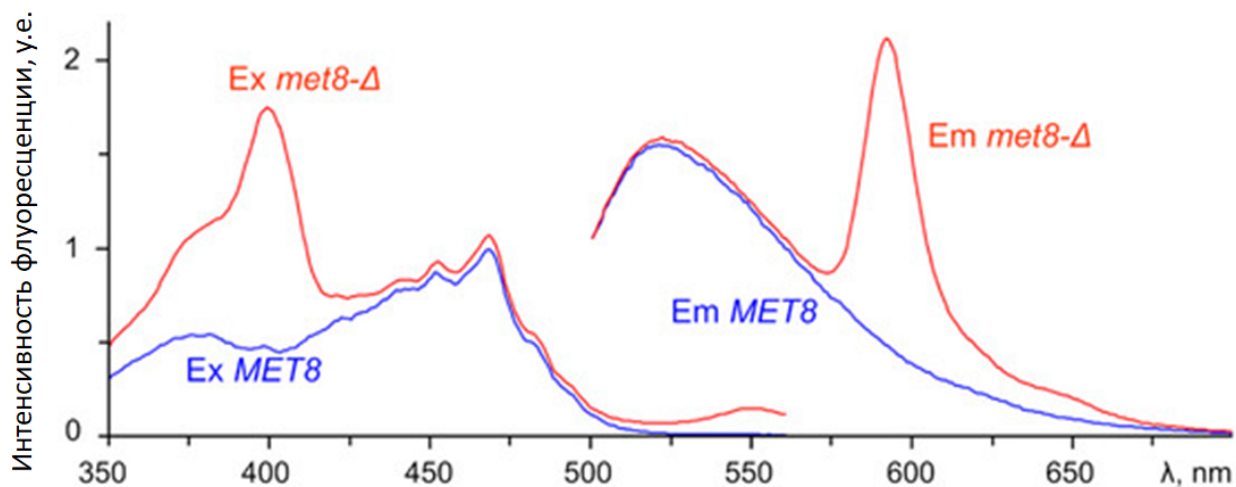


Рисунок 32 - Спектральные свойства клеток с делецией гена *MET8*

Более детальное изучение флуоресценции полученных штаммов было произведено с помощью проточной цитометрии. Было обнаружено, что на синтетической среде, на которой происходит первичный отбор трансформантов, свечение, вызванное делецией *Met8* довольно слабое, в то же время на полной среде YPD это свечение выражено намного более явно, рисунок 33. Подробное описание методики оценки флуоресценции представлено в приложении Б



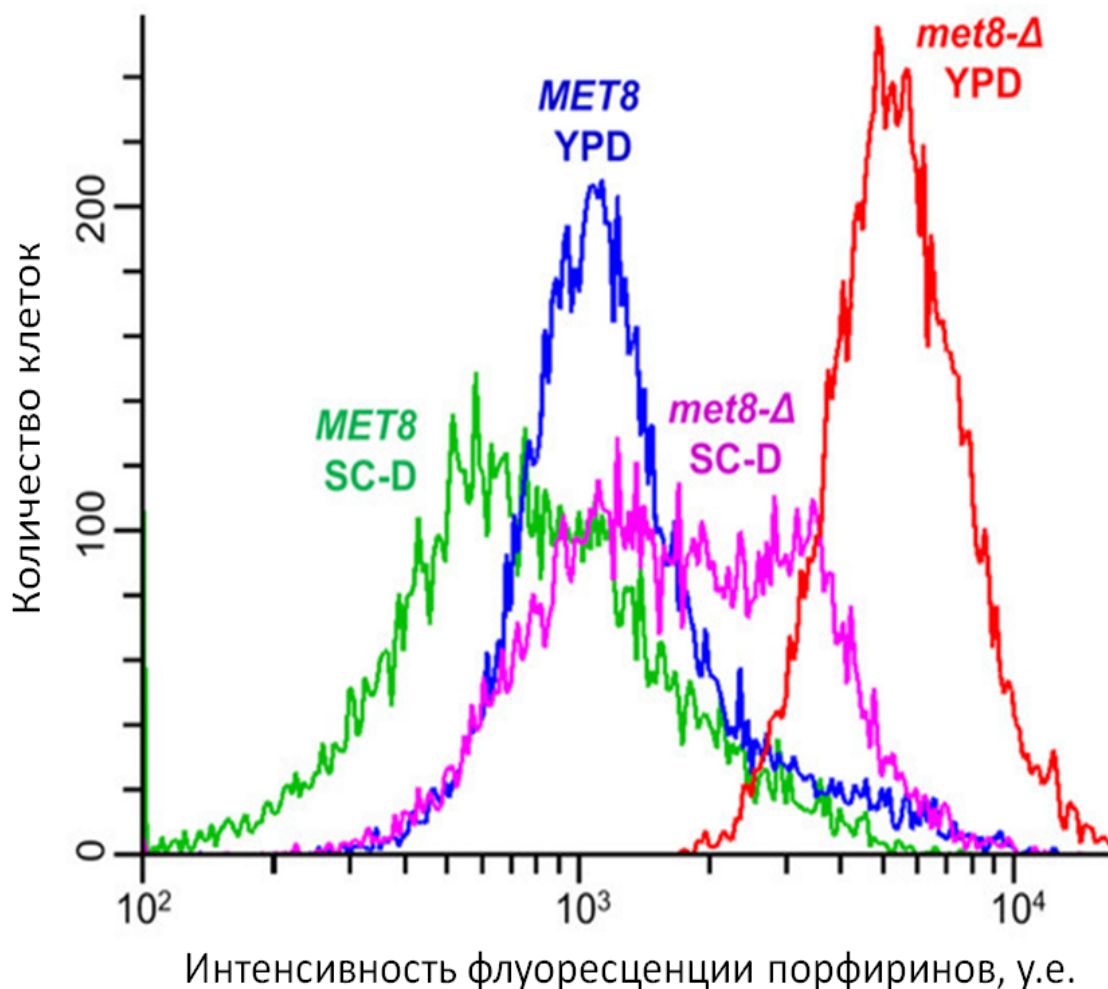


Рисунок 33 - Интенсивность флуоресценции порфирина изменяется в зависимости от среды культивирования

Поскольку было известно, что делеция гомолога MET8 вызывает ауксотрофность по росту на среде без метионина в дрожжах *S. cerevisiae* [63], нами было исследовано, проявляет ли данная делеция аналогичные свойства в метилотрофных дрожжах. Было продемонстрировано что клетки с делецией MET8 не растут на синтетической среде без метионина, и, аналогично мутантам, исходно полученным в ходе случайного мутагенеза, накапливают флуоресцентный порфирин. Это свойство позволяет легко получать ауксотрофные по метионину штаммы *Ogataea polymorpha*, скринируя штаммы, полученные путем случайного мутагенеза, на наличие флуоресценции порфирина, с последующим подтверждением его причины путем оценки наличия ауксотрофности по метионину.

Результаты данной работы вошли в состав статьи, опубликованной в журнале *Journal of Fungi*.

1.2.15 Разработка стратегии создания генетических конструкций с увеличенной продукцией транскрипционных факторов, включая Hac1 и Fhl1p. Создание генетической конструкции с увеличенной продукцией по крайней мере одного из транскрипционных факторов в *P. pastoris*. Подбор альтернативных промоторов для масштабируемого получения целевых белков в *P. pastoris*

Оверэкспрессия целевых белков в клетках дрожжей зачастую приводит к накоплению неправильно свернутых и дефектных белков в цитоплазме и эндоплазматическом ретикулуме. В результате процессы деления клеток, биосинтеза и экспорта белков замедляются, активируются различные стрессовые ответы, в том числе, протеасом-зависимая деградация неправильно-свернутых белков и так называемый ответ клетки на неправильно-свернутые белки (unfolded protein response - UPR). UPR вызывает арест трансляции, деградацию дефектных белков, накопление шаперонов [69]. Индуктором UPR генов является фактор транскрипции HAC1. Показано, что сверхэкспрессия гена HAC1 стимулирует процессы экспорта и созревания целевых белков в рекомбинантных штаммах дрожжей и грибов [97].

Транскрипционный фактор Fhl1p является активатором процессинга и усиливает продукцию рибосомных белков в метилотрофных дрожжах. Коэкспрессия Fhl1p при продукции рекомбинантной фитазы приводит увеличению ее уровня экспрессии на 20-35%, формированию полисом и увеличению общей трансляционной активности [42]. Более детальное изучение механизмов работы Fhl1p позволит нам прояснить эффекты коэкспрессии Fhl1p с другими белками, в частности, реннином. Для изучения влияния коэкспрессии факторов HAC1 и Fhl1p при экспрессии рекомбинантных белков были разработаны следующие конструкции, рисунки 34 и 35:

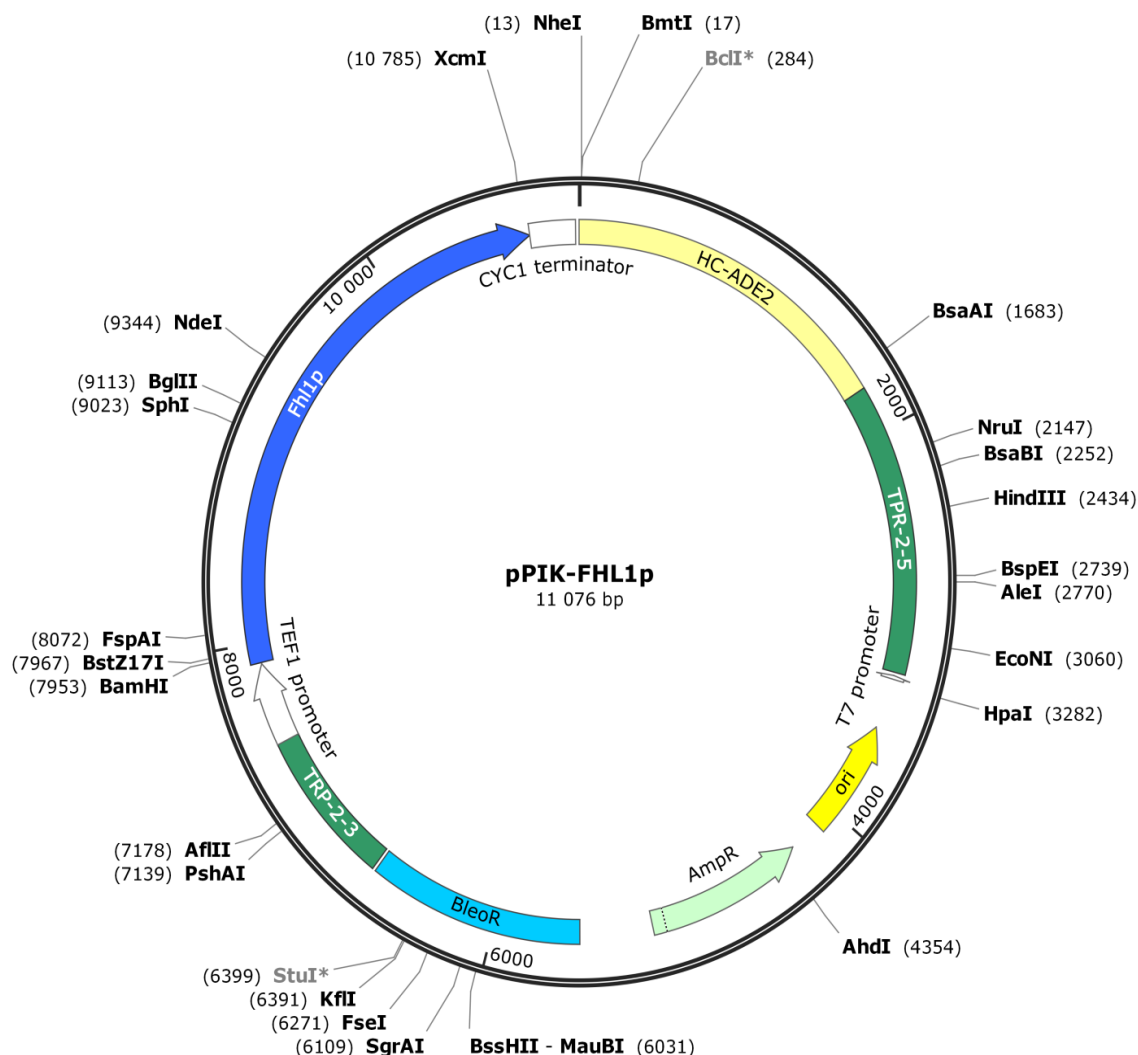


Рисунок 34 - Карта сборной плазмиды для экспрессии транскрипционного фактора FHL1p для совместной коэкспрессии рекомбинантных белков. Данный вектор общей длиной 11076 п.о. состоит из следующих элементов:

- а) HC LEU2 – ген LEU2 с укороченным промотором для многокопийной вставки;
- б) TRP2-5 – 5'-фрагмент локуса TRP2;
- в) Ori - бактериальная точка начала репликации;
- г) Amp<sup>r</sup> – ген резистентности к ампицилину;
- д) Bleo<sup>R</sup> – ген резистентности к антибиотику зеоцину;
- е) TRP2-3 – 3'-фрагмент локуса TRP2;
- ж) TEF1 promoter – конститутивный промотор фактора элонгации 1;
- з) Fhl1p – полноразмерный ген транскрипционного фактора Fhl1p;
- и) Терминатор транскрипции CYC1;

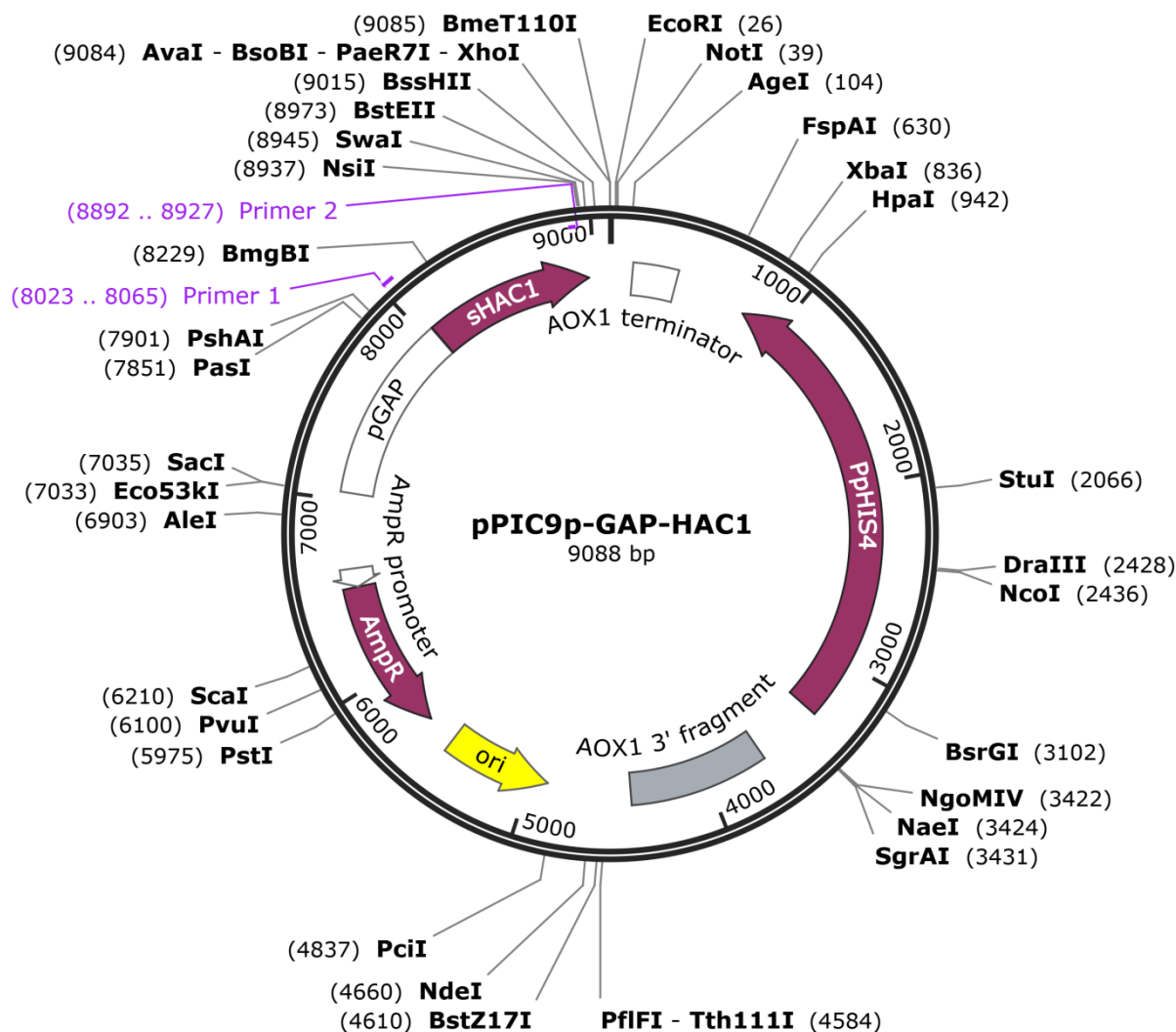


Рисунок 35 - Карта плазмиды для экспрессии сплайсированного варианта транскрипционного фактора HAC1 для совместной коэкспрессии рекомбинантных белков.

Данный вектор общей длиной 9088 п.о. состоит из следующих элементов:

- а) pGAP – конститутивный промотор глицеральдегид-фосфат дегидрогеназы GAP;
- б) sHAC1 – ген сплайсированного варианта транскрипционного фактора HAC1;
- в) AOX1tt – Терминатор транскрипции AOX1;
- г) PpHIS4 – ген фосфорибозил-АМР-циклогидролазы HIS4 *P. pastoris*;
- д) AOX13' – 3'-фрагмент локуса AOX1;
- е) Ori - бактериальная точка начала репликации;
- ж) Amp – ген резистентности к ампицилину.

Подбор альтернативных промоторов для масштабируемого получения целевых белков в *P. pastoris*.

***Разработка генетических конструкций для коэкспрессии транскрипционных факторов HAC1 и Fhl1p***

Фрагмент гена HAC1 был получен из штамма GS-115 (Invitrogen, США). При помощи праймеров F-HAC1/HAC1\_SPL2 и R\_HACAge/HAC1\_SPL1 был амплифицированы фрагменты гена HAC1 и HAC2 (35 циклов, 94°C /45 сек, 58°C/30 сек, 72°C/80 сек). При помощи праймеров pPiGAPSac/pPiGAPR был амплифицирован промотор pPiGAP. При помощи последующего раунда ПЦР полученные фрагменты были лигированы в фрагмент PiGAPHAC и клонированы в плазмиду pPIC9 по сайтам рестрикции SacI/AgeI.

Дорожки 1,2 - полученный фрагмент pPiGAP 1000 п.о., дорожки 3,4 - полученные фрагменты HAC1 900п.о., дорожки 5,6 фрагмент HAC2 250 п.о.

Праймер	Последовательность
pPiGAPSac	GGTGAGCTCAGATCTCTGCTACTCTGGTCCCAAGTGAA
F_HAC1	TGAACAАСТАТСААТТСГАААСАСАГАТСГСАГААААТГСССГ
R_HACAge	GTACCGGTACCCAAAAGAATGAAAACGACCC
HAC1_SPL1	TTGCATCATCCAGCAGCACCATTTACCGCTAATGCA
HAC1_SPL2	GTAAATGGTGCTGCTGGATGATGCAACCGATTСGAC
pPiGAPR	TGTTTCGAATTGATAGTTGTTCAATTGATTGAAATAGGG

Фрагмент гена PiGAPHAC:

GGTGAGCTCAGATCTCTGCTACTCTGGTCCCAAGTGAACCACCTTTTGGACCCTATTGACCGGACCT  
TAACTTGCCAAACCTAAACGCTTAATGCCTCAGACGTTTTAATGCCTCTCAACACCTCCAAGGTTGC  
TTTCTTGAGCATGCCTACTAGGAACTTTAACGAACTGTGGGGTTGCAGACAGTTTCAGGCGTGTCCC  
GACCAATATGGCCTACTAGACTCTCTGAAAAATCACAGTTTTCCAGTAGTTCCGATCAAATTACCAT  
CGAAATGGTCCCATAAACGGACATTTGACATCCGTTCCCTGAATTATAGTCTTCCACCGTGGATCATG  
GTGTTCCTTTTTTTTCCCAAAGAATATCAGCATCCCTTAACTACGTTAGGTCAGTGATGACAATGGAC  
CAAATTGTTGCAAGTTTTTTCTTTTTCTTTTCATCGGCACATTTACGCTCACATGCGACTATTATCGA  
TCAATGAAATCCATCAAGATTGAAATCTTAAAATTGCCCTTTCACTTGACAGGATCCTTTTTTTGTA  
GAAATGTCTTGGTGTCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCC  
GAACGACCTGCTGGCAACGTAAAATTCTCCGGGGTAAAACCTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGA  
AACGTCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAG  
AGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTC  
GTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCG  
GACGCATGTCATGAGATTATTGAAACCACCAGAATCGAATATAAAAGGCGAACACCTTTCCAAT  
TTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTTATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAAC  
TATCAATTCGAAACACAGATCGCAGAAAATGCCGTAGATTCTTCTCATAAGACAGCTAGCCCACT  
TCCACCTCGTAAAAGAGCAAAGACGGAAGAAGAAAAGGAGCAGCGTCGAGTGGAACGTATCCTAC  
GTAATAGGAGAGCGGCCCATGCTTCCAGAGAGAAGAAACGAAGACACGTTGAATTTCTGGAAAAC  
CACGTCGTCGACCTGGAATCTGCACTTCAAGAATCAGCCAAAGCCACTAACAAGTTGAAAGAAAT  
ACAAGATATCATTGTTTCAAGGTTGGAAGCCTTAGGTGGTACCGTCTCAGATTTGGATTTAACAGTT  
CCGGAAGTCGATTTTCCCAAATCTTCTGATTTGGAACCCATGTCTGATCTCTCAACTTCTTCGAAAT  
CGGAGAAAGCATCTACATCCACTCGCAGATCTTTGACTGAGGATCTGGACGAAGATGACGTCGCTG  
AATATGACGACGAAGAAGAGGACGAAGAGTTACCCAGGAAAATGAAAGTCTTAAACGACAAAAA  
CAAGAGCACATCTATCAAGCAGGAGAAGTTGAATGAACTTCCATCTCCTTTGTCATCCGATTTTCA  
GACGTAGATGAAGAAAAGTCAACTCTCACACATTTAAAGTTGCAACAGCAACAACAACAACCAGT  
AGACAATTATGTTTCTACTCCTTTGAGTCTTCCGGAGGATTCAGTTGATTTTATTAACCCAGGTAAC  
TTAAAAATAGAGTCCGATGAGAACTTCTTGTTGAGTTCAAATACTTTACAAATAAAACACGAAAAT  
GACACCGACTACATTACTIONACAGCTCCATCAGGTTCCATCAATGATTTTTTTAATTCTTATGACATTA  
GCGAGTCGAATCGGTTGCATCATCCAGCAGCACCATTTACCGCTAATGCATTTGATTTAAATGACTT  
TGTATTCTTCCAGGAATAGGTTACCATCTATACTTCCATTGATTTTACGCGAGGTATGTGGCGCGCA  
A

### Сборка плазмиды pVR2-ADE2

Аmplификация фрагментов генов TPR2-3, TPR2-5, pVR2 проводилась методом ПЦР с использованием праймеров, таблица 24, Полинуклеотидные последовательности соответствующих фрагментов приведены на рисунке 36 (А-Г). ПЦР проводилась с использованием полимеразы Q5 (NEB) и dNTP (ThermoFisher Scientific, США). В качестве матрицы были выделены геномные ДНК соответствующих штамма X-33 *P.pastoris*. Условия ПЦР для амплификации фрагмента гена *TPR2-3* (786 п.о.), были (95 °C – 5 мин, (95 °C – 1,5 мин, 58 °C – 1 мин, 68 °C – 90 сек) – 20 циклов, 68 °C – 10 мин, 4 °C - ∞), фрагмента гена *TPR2-5* (1455 п.о.), были (95 °C – 5 мин, (95 °C – 1,5 мин, 58 °C – 1 мин, 68 °C – 90 сек) – 20 циклов, 68 °C – 10 мин, 4 °C - ∞), ген *ADE2* (1840 п.о.), (95 °C – 5 мин, (95 °C – 1 мин, 60 °C – 1 мин, 68 °C – 80 сек) – 25 циклов, 68 °C – 10 мин, 4 °C - ∞) и фрагмент вектора *pVR2* (3626 п.о.), (95 °C – 5 мин, (95 °C – 1 мин, 59 °C – 1 мин, 68 °C – 60 сек) – 25 циклов, 68 °C – 10 мин, 4 °C - ∞). Фрагмент *Fh11p* (3572 п.о.) предполагается амплифицировать (95 °C – 5 мин, (95 °C – 1 мин, 50 °C – 80 сек, 68 °C – 60 сек) – 25 циклов, 68 °C – 10 мин, 4 °C - ∞). Клонирование ПЦР-продуктов в единый вектор предполагается проводить по методу Гибсона.

Таблица 24 - Праймеры, использованные для амплификации целевых генов

ADE2 for	CCT AGG CAA ACT CTC ATG GAT TCT
ADE2 rev	CCT AGG ACT GCC AGG CTC TAA
TPR2-5 for	TCA ATC TCC TGA GGT GCA ACA
TPR2-5 rev	TGT GAT GAT TTT GTT GTT GTT GTC GG
TRP2-3 for	AAG TTG TTG GTG CTT CAC CT
TPR2-3 rev	AGT CGA GAG TGC AAA ACT GG
pVR2_fwd	CGA CAA CAA CAA CAA AAT CAT CAC AGA ATT CAT CGA TGA TAT CAG ATC C

Продолжение таблицы 24

pVR2_rev	AAT TCA GGT GAA GCA CCA ACA ACT TGA ATT CAG CTT GCA AAT TAA AGC C
TRP2-5_fwd	TTG GTT AGA GCC TGG CAG TCC TAG GTC AAT CTC CTG AGG TGC AAC AAG AAA C
TRP2-5_rev	TGG ATC TGA TAT CAT CGA TGA ATT CTG TGA TGA TTT TGT TGT TGT TGT CG
Fhl1p_not_rev	CAA GCG GCC GCC TAT TGT TCT GAT TTG GCC A
Fhl1p_xho_fwd	TAT CTC TCG AGA AAA GAG AGG CTG AAG CTA TGA TGA GTG TTA GCT CT
HC-ADE2_rev	TTC TTG TTG CAC CTC AGG AGA TTG ACC TAG GAC TGC CAG GCT CTA AC
HC-ADE2_fwd	GAT TAA GTG AGA CCT TCG TTT GTG CGC CTA GGC AAA CTC TCA TGG ATT CTC
TRP2-3_rev	TTC AAC CTT TCG TCT TTG GAT GTT AAG TCG AGA GTG CAA AAC TG
TRP2-3_fwd	CGA AGG CTT TAA TTT GCA AGC TGA ATT CAA GTT GTT GGT GCT TCA C

***Выбор промотора и терминатора транскрипции***

Инициация транскрипции - существенный этап экспрессии белка. Следовательно, использование *P. pastoris* как фабрики ферментов или метаболитов для синтетических микробных клеток к ферментам требует идентификации, характеристики и конструирования индуцибельных и конститутивных промоторов для *P. pastoris*. С этой целью были охарактеризованы и в дальнейшем активно используются многие природные сильные, строго регулируемые индуцибельные промоторы.

Наиболее распространенные на данный момент промоторы в системе *P. pastoris* это индуцируемый метанолом алкоголь-оксидазы AOX1 промотор [76] и конститутивный



промотор глицеральдегид-фосфат дегидрогеназы GAP [104]. pAOX1 обеспечивает высокую активность при индукции метанолом [83]. pGAP промотор обеспечивает постоянную продукцию рекомбинантных белков, однако не подходит для продукции токсичных для клетки белков. Кроме того, некоторое количество природных и синтетических промоторов охарактеризовано в последнее время [6; 95; 105]. Наибольший интерес для биотехнологии представляет G1 промотор транспортера глюкозы G1[94].

Путем исследования и уточнения использования пути метаболизма рамнозы у *P. pastoris*, два промотора, индуцируемых рамнозой, были охарактеризованы как отличные кандидаты для получения пищевых и терапевтически значимых белков. Точно так же всесторонний анализ транскриптома *P. pastoris*, позволил идентифицировать многие промоторы, зависящие от новых источников углерода. Совсем недавно была описана регуляция утилизации метанола у *P. pastoris* и успешно идентифицирован набор сильных и слабых индуцируемых метанолом промоторов, которые не только запускали строго регулируемую высокую коэкспрессию целевых генов для сбалансированного метаболизма, но и повышали их генетическую стабильность путем использования различных промоторных последовательностей ДНК. На сегодняшний день доступен большой набор индуцибельных и конститутивных животных промоторов дикого типа. Но для производства промышленных ферментов и тонкой настройки экспрессии генов в метаболической инженерии и синтетической биологии необходимо использовать и новые короткие искусственные промоторы с разными свойствами. В связи с этим на основании выявления цис-активирующих элементов регуляции гена AOX2 и положительно действующих факторов транскрипции (MXR1) у *P. pastoris*, была разработана новая библиотека коротких синтетических промоторов P<sub>AOX1</sub>-, объединивших цис-элементы с базальным промотором. Впоследствии путем слияния цис-элементов и коровых фрагментов промотора были сконструированы и успешно применяются для улучшения производства свиного трипсиногена синтетические индуцируемые промоторы. В свете стратегий создания промоторов, ориентированных на регуляторные последовательности (URS), 5'-нетранслируемая область (UTR) и последовательность корового промотора разработана группа синтетических коровых промоторов *P. pastoris*, которые упростят создание новых конструкций для экспрессии белков. Кроме того, из-за токсичности метанола для *P. pastoris* и человека, разумно вводить в «клеточные фабрики» *P. pastoris* другие индуцибельные или конститутивные промоторы, особенно для производства ферментов и метаболитов, применяемых в пищевой промышленности. Фактически, по сравнению с промоторами, индуцируемыми метанолом,

процесс культивирования клеток несущих конститутивные промоторы всегда упрощается, а конститутивный промотор PGAP применяется для крупномасштабного производства ферментов. Более того, продемонстрировано, что во многих случаях конститутивные промоторы могут демонстрировать высокие уровни экспрессии ферментов по сравнению с P<sub>AOX1</sub>. Таким образом, желательна постройка библиотеки альтернативных синтетических конститутивных или индуцибельных промоторов. Для облегчения точной настройки и точного контроля экспрессии генов, посредством мутагенеза конститутивного промотора pGAP была создана функциональная библиотека промоторов с диапазоном активности от 0,6% до превышения активности почти в 19,6 раза. Кроме того, после исследования архитектуры нуклеосом была успешно реализована *de novo* разработка синтетических промоторов в *S. cerevisiae* с использованием компьютерных методов. С точки зрения метаболической инженерии, желателен динамический контроль ферментов метаболического пути путем применения промоторов реакции ответа на стресс. Изменяя сайты связывания факторов транскрипции в UAS промотора YGP1, существенно возрастал ответ при низких значениях pH. На основе этого из неродственного CCW14 промотора был сконструирован новый pH зависимый промотор с низким pH  $\leq 3$ , который показывал десятикратное увеличение в производстве молочной кислоты по сравнению со стандартным промотором TEF1. Таким образом, в ближайшем будущем можно ожидать создания широкого спектра промоторов для *P. pastoris*.

Помимо промоторов, терминаторы транскрипции, которые определяют положение терминации транскрипции и добавление поли-(A) фрагментов также играют важную роль в регуляции стабильности мРНК и уровня экспрессии дрожжевых генов. Продemonстрировано, что комбинаторная оптимизация промоторов и терминаторов - эффективная стратегия для балансировки метаболических путей. Следовательно, для конструирования терминатора дрожжей для синтетической биологии необходимы скриннинг и отбор терминаторов или создание коротких синтетических терминаторов. Поэтому были всесторонне изучены терминаторные области *S. cerevisiae* в масштабе всего генома, что не только привело к созданию набора инструментов для выбора терминатора, но и дополнило представления о модуляторной роли терминатора. С другой стороны, была успешно разработана и охарактеризована панель коротких (35–70 п.н.) синтетических терминаторов регуляции экспрессии генов *S. cerevisiae*. Кроме того, синтетические терминаторы функциональны в других метилотрофных дрожжах, таких как *Yarrowia lipolytica*, и предполагается, что возможен перенос этих синтетических

терминаторов между различными видами дрожжей. Недавно была разработана действенная стратегия создания ортогональных синтетических терминаторов для регуляции экспрессии генов, эффективной сборки транскрипционных единиц и стабильной хромосомной интеграции. Эти стандартизированные короткие терминаторы одинаковой длины разделяют несколько гомологичных последовательностей, которые не только облегчают процесс, но и снижают риск нежелательных событий рекомбинации. Хотя фундаментальные знания и инструменты работы с *P. pastoris* ограничены по сравнению с *S. cerevisiae*, большая часть регуляторных элементов, включая промоторы и терминаторы, совпадают у *S. cerevisiae* и *P. pastoris*. Это упрощает разработку и создание коротких искусственных терминаторов для *P. pastoris*.

На данный момент нет полноценного понимания того, как работает метанол-индуцируемый промотор АОХ1. Фактически, переход на метанол и активация АОХ1 осуществляется при соблюдении двух условий (сигналов): деплеция глюкозы и сигнал о присутствии в окружающей среде метанола, рисунок 36.

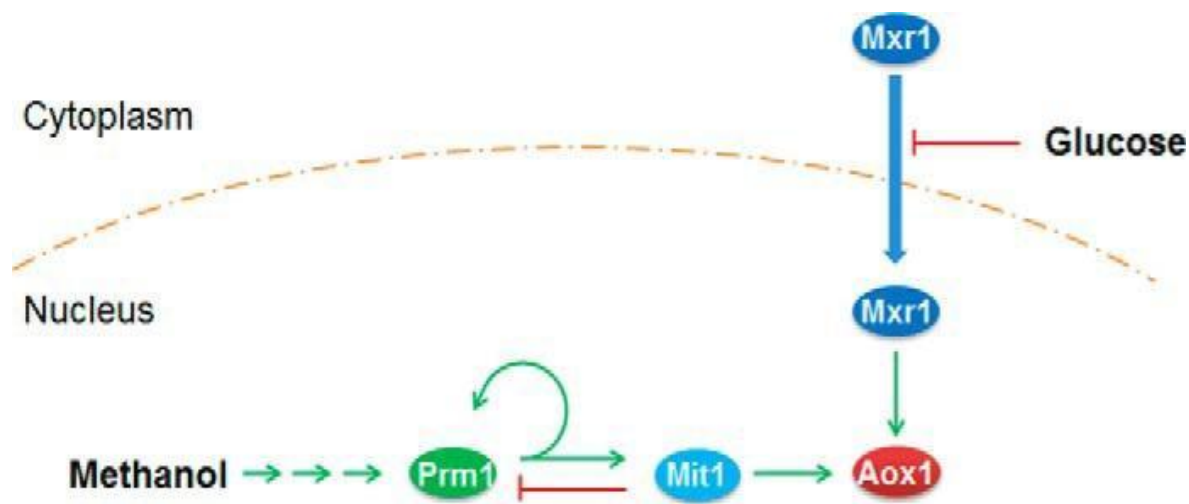


Рисунок 36 - Схема активации АОХ1 промотора. На данный момент обнаружено три транскрипционных фактора, участвующих в запуске АОХ1 промотора: Mxr1, Prm1, Mit1. Mxr1 находится по умолчанию в цитоплазме, как только пропадает глюкоза, он из цитоплазмы переходит в ядро и там принимает участие в активации АОХ1 промотора [67]. Данные белки представляют собой структурно «цинковые пальцы»

Сигнал о присутствии в среде метанола активирует выработку Prm1 и он сам себя активирует и активирует Mit1, который по сигналу обратной связи останавливает наработку Prm1 и активирует наработку АОХ1. Mxr1 играет важную роль в индукции транскрипции АОХ1

и других генов MUT-биосинтетического пути, экспрессию PEX генов (генов сборки пероксисомы). Mxr1 имеет 6 сайтов связывания на промоторе AOX1. Для активации AOX1 нужен и сигнал от Mxr1, и сигнал от Mit1.

Кроме этого существует два репрессора Nrg1 и C4qzn3.

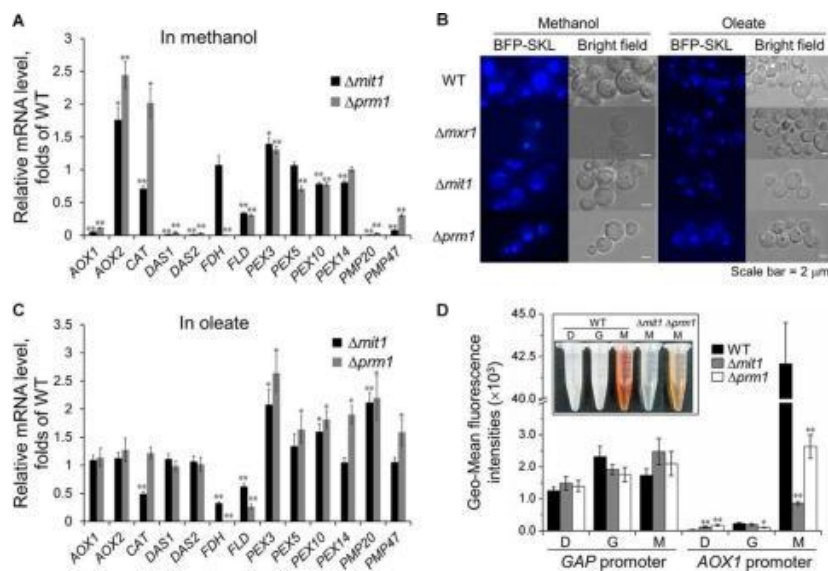


Рисунок 37 - Влияние делеций транскрипционных факторов  $\Delta$ mxr1,  $\Delta$ mit1,  $\Delta$ prp1 на экспрессию рекомбинантных белков под действием различных промоторов

Существуют и проверены несколько комбинаторных способов использования для эксплуатации этой системы. Так, Wang и его коллеги [67] создали штаммы с делециями по всем трем транскрипционным факторам  $\Delta$ Mit1,  $\Delta$ Mxr1,  $\Delta$ Prp1, рисунок 37.

$\Delta$ Mit1 клетки не могут расти в присутствии метанола, однако их время деления осталось неизменным в присутствии глюкозы, глицерола, этанола, сорбитола и олеиновой кислоты. Т.о. Mit1 необходим для роста в присутствии метанола.

Таблица 25 - Репрессия и дерепрессия для различных промоторов пути MUT у метилотрофных дрожжей в зависимости от источника углерода

Вид метилотрофных дрожжей	Промотор	Влияние глюкозы, этанола	Влияние глицерина	Влияние метанола	Эффективность индукции глицерином и метанолом
<i>P. pastoris</i> [61, 62, 83, 92, 93]	<i>AOX1</i>	Repression	Repression	Induction	Repression
	<i>AOX2</i>	Repression	Repression	Induction	Repression
<i>H. polymorpha</i> [76, 88–91]	<i>MOX</i>	Repression	Derepr. (~60–70%)	Induction	Induction (~100%)
	<i>FMD</i>	Repression	Derepr. (~60%)	Induction	
<i>C. boidinii</i> [57, 68, 70, 71, 86, 87]	<i>AOD1</i>	Repression	Derepr. (~3–30%)	Induction	Induction (~90%)
	<i>FLD</i>	No activity	Derepr. (~20%)	Induction	Induction (~70%)
	<i>FDH</i>	Repression	No activity	Induction	Induction (~30%)
	<i>DAS</i>	Repression	Derepr. (~2%)	Induction	Induction (~70%)
<i>P. methanolica</i> [78, 82, 100, 101]	<i>MOD1</i>	Repression	Derepr. (~60–70%)	Induction	Induction (~100%)
	<i>MOD2</i>	Repression	No activity	Induction	Induction (~100%)
	<i>FLD</i>	No activity	Derepr. (~20%)	Induction	Induction (~70%)

Mxr1 играет важную роль в индукции транскрипции *AOX1* и других генов вовлеченных в MUT путь и контролирует репрессию при присутствии глюкозы. Возможны системы, в которых при коэкспрессии Mxr1 под *AOX2* промотором, можно повысить продукцию целевого белка.

Таблица изменения уровня транскрипции различных генов от Zhang [102]. оказано изменение уровня экспрессии по фазам роста на средах. G- глицерин, GM- глицерин-метанол, M- метанол. В качестве предполагаемого сенсора уровня метанола предполагается белок Wsc, рисунок 38 [75].

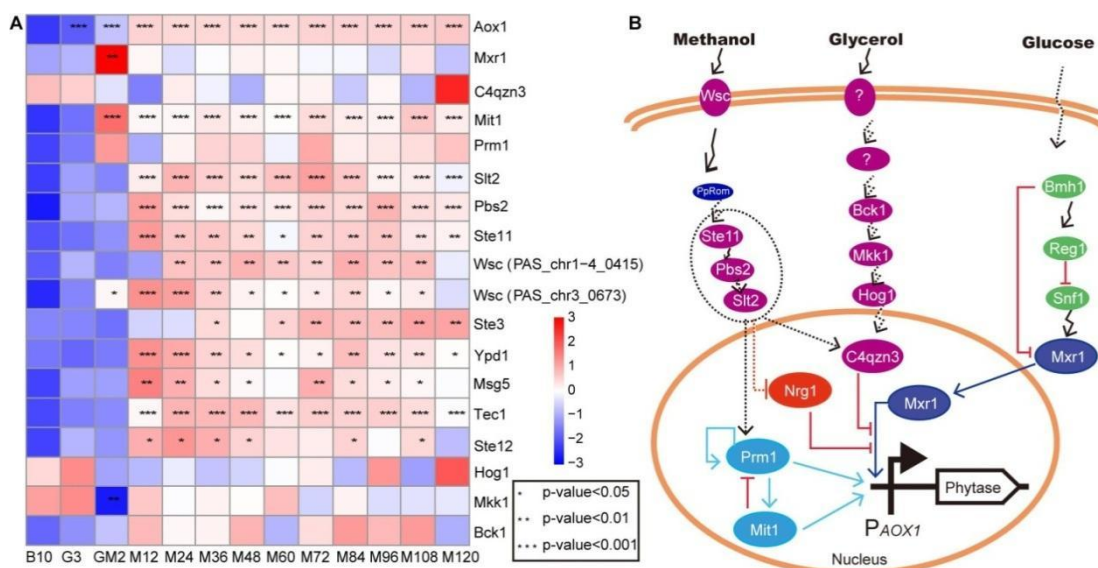


Рисунок 38 - Динамика изменений транскриптов генов при активации сенсора метанола Wsc в процессе активации метанол-индуцированного промотора AOX1

Использование ортологичных промоторов *P. pastoris* позволяет получать более высокий уровень экспрессии GFP и различных белков. Наиболее перспективным из них является **FMD** промотор. Возможно редактирование ADH2 промотора таким образом, чтобы увеличить уровень экспрессии. Использовался Genomatix Suite для детекции участков связывания и создания полусинтетических промоторов с улучшенными свойствами [37]. Для детекции промотора GTN1 и создания полусинтетического гликолитического промотора G1-3 для Lonza также использовали Matinspector от (Genomatix) [94].

Используя промотор с неполной депрессией по глюкозе, глицерину можно добиться высокого уровня продукции при экспрессии рекомбинантных белков по метанол-индуцированному промотору (используя промотор **Hp MOX** из дрожжей *Hansenula polymorpha*). При экспрессии под конститутивными промоторами GAP факторов транскрипции Mit1, Prm1, Mxr1 можно добиться метанол-независимой активации AOX1 промотора [65]. Другим вариантом использования метанол независимой продукции является использование дерепрессированного **Hp MOX** промотора [79]. Для более удобной детекции уровня экспрессии разработана система аутоиндукции для AOX1 промотора, Amgen разработал среду для аутоиндукции *Pichia* при росте на 48 ч [10]. Данная система имеет свои минусы (двойное

содержание YNB и биотина) и преимущества (нет необходимости менять среду при переходе от глюкозы к метанолу).

1.2.16 Проведение экспериментальной ферментации штамма *P.verruculosum* в ферментере V= 50 л с наработкой партии ферментных препаратов фитазы для отработки технологической схемы культивирования гриба

Данные работы были выполнены ООО «Агрофермент» в рамках предоставления внебюджетного финансирования.

В рамках проекта было проведено 2-е экспериментальных ферментации в объеме 50 л для штамма-продуцента моно-фитазы, имеющегося на производстве и являющегося основой ферментного препарата «АГРОФИТ». Смысл проводимых экспериментов состоял в изменении среды для инокулята и замене дрожжевого экстракта на соевую муку, что приводит к удешевлению процесса в целом. Следует заметить, что экспериментальный объем ферментации в 50 л предполагает использование 5 л среды для инокулята (1/10 объема ферментера), однако производственные мощности предприятия «Агрофермент» составляют ферментационные емкости объемом 10 м 40 куб, поэтому замена одного дорогостоящего компонента в среде для инокулята ведет к улучшению экономических показателей процесса.

#### *1.2.16.1 Протокол ферментации №1 в V=50 л*

*Получение инокулята в лаборатории по существующей схеме (ферментация сравнения) (8-18.11.2021), таблицы 26-28.*

Состав (г/л) и приготовление питательной среды

Глюкоза	25,0
Дрожжевой экстракт	10,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15,0
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	5,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,3
CaCl <sub>2</sub>	0,23
Пенегаситель	0,5
<i>pH (исходный)</i>	<i>5,8-6,0</i>

Приготовили 5 л питательной среды: pH – 6,0 стерилизация: 1 атм., 121 °С, 60 мин

Стерилизация 50 % р – ра глюкозы 0,5 атм (112°) 30 мин.

*Посевной материал*

**08.11.2021г.** Посев с пробирки (косяк) на колбу,  $V_{\text{пс}} = 200$  мл; время роста 48 часов.

**10.11.2021г.** Пересев из колбы в бутылку (5л ПС), при температуре  $(30 \pm 2)^\circ \text{C}$ , 47 часов

ПС: стер рН= 5,85



Таблица 26 - Подготовка технологического оборудования

Дата	Наименование оборудования	Техническое состояние	Время мойки			Стерилизация			ФИО оператора	Подпись
			вода	кислота	щелочь	время, мин	температура	давление, МПа		
08.11.21	Ф-50л	Исправен	1 час, 80 °С	1 час, 75 °С	4 часа, 75 °С	60 мин	130 – 132	2,2		

Таблица 27 - Приготовление питательных сред и добавок

Дата приготовления	Наименование питательной среды или добавки	Наименование компонентов	Количество кг	Количество г/л	Емкость приготовления	Режим стерилизации	Подпись
10.11.2021	Питательная среда для <i>Penicillium verruculosum</i>	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (монофосфат калия)	0,49	14	Ф-50л	1) 121 - 123 °С, 1,1 атм, 30 мин  Время выдержки - 6 часов  2) 112 - 115 °С, 0,5-0,7 атм, 30 мин	
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (сульфат аммония)	0,35	10			
		MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O (магний сернокислый)	0,021	0,6			
		CaCl <sub>2</sub>	0,021	0,6			
		Дрожжевой автолизат	0,35	10			
		Кукурузный экстракт	1,4	40			
		Пшеничные отруби	0,35	10			
		МКЦ	1,40	40			
Пенегаситель (Лапрол)	50 мл	1,4					
10.11.2021	Углеводная часть питательной среды	Глюкоза	1,05		Бутыль		
10.11.2021	Углеводная подпитка	Глюкоза	1,05		2 Бутыли		
10.11.2021	Углеводно - целлюлозная подпитка	Глюкоза	1,05		3 Бутыли		
		МКЦ	0,91				

Таблица 28 - Протокол технологического режима наработки культуральной жидкости *Penicillium verruculosum* в Ф-50л (№1)

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фита за ед/мл	Белок мг/мл	Примечание
											Угл	Цел	Дрож автол					
12.11	15:00	Засев	35,0	1,0	31,5	5,15	10	2,0						3,0	220,0			
	16:00	1	35,0	1,0	31,6	5,15	10	2,0										
	17:00	2	35,0	1,0	31,5	5,16	10	2,0										
	18:00	3	35,0	1,0	31,6	5,16	10	2,0										
	19:00	4	35,0	1,0	31,5	5,16	10	2,0										
	20:00	5	35,0	1,0	31,6	5,17	10	2,0										
	21:00	6	35,0	1,0	31,6	5,17	10	2,0										
	22:00	7	35,0	1,0	31,5	5,18	20	2,0										
	23:00	8	35,0	1,0	31,5	5,18	30	2,0										
13.11	00:00	9	35,0	1,0	31,5	5,19	30	2,0										
	01:00	10	35,0	1,0	31,5	5,20	30	2,0										
	02:00	11	35,0	1,0	31,5	5,20	30	2,0										
	03:00	12	35,0	1,0	31,5	5,22	30	2,0										
	04:00	13	35,0	1,0	31,5	5,22	30	2,0										
	05:00	14	35,0	1,0	32,5	5,23	30	2,0										
	06:00	15	35,0	1,0	31,9	5,24	30	2,0										
	07:00	16	35,0	1,0	31,5	5,25	30	2,0										
	08:00	17	35,0	1,0	32,1	5,27	30	2,0						2,5	235,0			
	09:00	18	35,0	1,0	31,5	5,28	30	2,0										
	10:00	19	35,0	1,0	31,5	5,30	30	2,0										
	11:00	20	35,0	1,0	31,5	5,32	30	2,0										
	12:00	21	35,0	1,0	31,6	5,34	30	2,0										
	13:00	22	35,0	1,0	31,5	5,37	30	2,0										

Продолжение таблицы 28

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фита за ед/мл	Белок мг/мл	Примечание
											Угл	Цел	Дрож автол					
	14:00	23	35,0	1,0	31,5	5,37	30	2,0										
	15:00	24	35,0	1,0	31,6	5,18	30	2,0										
	16:00	25	35,0	1,0	31,9	5,05	30	2,0										
	17:00	26	35,0	1,0	32,2	4,92	30	2,0										
13.11	18:00	27	35,0	1,0	32,4	4,88	30	2,0					1,3	490,0				
	19:00	28	35,0	1,0	32,3	4,87	30	2,0										
	20:00	29	34,0	1,0	32,1	4,98	30	2,0										
	21:00	30	34,0	1,0	32,5	4,88	40	3,0										
	22:00	31	34,0	1,0	32,5	4,90	40	3,0										
	23:00	32	34,0	1,0	32,5	4,84	40	3,0										
14.11	00:00	33	34,0	1,0	32,5	4,89	40	3,0										
	01:00	34	34,0	1,0	32,5	4,91	40	3,0										
	02:00	35	34,0	1,0	32,4	4,93	40	3,0										
	03:00	36	34,0	1,0	32,5	4,96	40	3,0										
	04:00	37	33,0	1,0	32,5	4,89	40	3,0										
	05:00	38	33,0	1,0	32,4	4,97	40	3,0										
	06:00	39	33,0	1,0	32,3	4,98	40	3,0										
	07:00	40	33,0	1,0	32,4	4,94	40	3,0										
	08:00	41	33,0	1,0	32,2	4,99	40	3,0					0,15	375,0				

Продолжение таблицы 28

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фита за ед/мл	Белок мг/мл	Примечание
											Угл	Цел	Дрож автол					
	09:00	42	33,0	1,0	32,5	5,00	40	3,0										Подали 1л воды
	10:00	43	34,0	1,0	32,4	5,01	40	3,0										
	11:00	44	34,0	1,0	32,5	5,11	40	3,0			3 л							
	12:00	45	34,0	1,0	32,4	4,89	40	3,0										
	13:00	46	34,0	1,0	32,4	4,92	40	3,0										
	14:00	47	34,0	1,0	32,2	4,99	40	3,0										
	15:00	48	34,0	1,0	32,5	4,96	40	3,0										
	16:00	49	34,0	1,0	32,4	5,01	40	3,0										
	17:00	50	34,0	1,0	32,4	4,95	40	3,0										
	18:00	51	34,0	1,0	32,3	4,98	40	3,0					1,1	304,4				
	19:00	52	33,0	1,0	32,4	4,90	40	3,0										
	20:00	53	33,0	1,0	32,5	4,91	40	3,0										
14.11	21:00	54	33,0	1,0	32,3	4,82	40,0	3,0										
	22:00	55	33,0	1,0	32,5	4,94	40,0	3,0										
	23:00	56	33,0	1,0	32,4	4,95	40,0	3,0										
15.11	00:00	57	33,0	1,0	32,5	4,87	40,0	3,0										
	01:00	58	33,0	1,0	32,4	4,89	40,0	3,0										
	02:00	59	33,0	1,0	32,2	4,91	40,0	3,0										
	03:00	60	33,0	1,0	32,2	4,93	40,0	3,0										
	04:00	61	33,0	1,0	32,4	4,84	40,0	3,0										
	05:00	62	33,0	1,0	32,4	4,95	40,0	3,0										
	06:00	63	33,0	1,0	32,3	4,85	40,0	3,0										

Продолжение таблицы 28

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фита за ед/мл	Белок мг/мл	Примечание	
											Угл	Цел	Дрож автол						
	07:00	64	33,0	1,0	32,2	4,97	40,0	3,0											
	08:00	65	33,0	1,0	32,2	5,00	40,0	3,0						0,09	364,0				
	09:00	66	33,0	1,0	32,4	4,88	40,0	3,0											
	10:00	67	33,0	1,0	32,5	4,95	40,0	3,0											
	11:00	68	33,0	1,0	32,3	4,99	40,0	3,0			3 л								
	12:00	69	33,0	1,0	32,5	4,89	40,0	3,0											
	13:00	70	33,0	1,0	32,4	4,89	40,0	3,0											
	14:00	71	33,0	1,0	32,2	4,96	40,0	3,0											
	15:00	72	33,0	1,0	32,4	4,92	40,0	3,0											
	16:00	73	33,0	1,0	32,5	4,82	40,0	3,0											
	17:00	74	33,0	1,0	32,0	4,88	40,0	3,0											
	18:00	75	33,0	1,0	32,5	4,96	40,0	3,0						0,18	345,0	1270,0	31,5		
	19:00	76	33,0	1,0	32,3	5,00	40,0	3,0											
	20:00	77	35,0	1,0	32,0	4,91	40,0	3,0											
	21:00	78	35,0	1,0	32,4	4,93	40,0	3,0											
	22:00	79	35,0	1,0	32,3	5,03	40,0	3,0											
	23:00	80	35,0	1,0	32,5	4,94	40,0	3,0											

Продолжение таблицы 28

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фита за ед/мл	Белок мг/мл	Примечание
											Угл	Цел	Дрож автол					
16.11	00:00	81	35,0	1,0	32,5	4,97	40	3,0										
	01:00	82	35,0	1,0	32,5	4,90	40	3,0										
	02:00	83	35,0	1,0	32,4	4,82	40	3,0										
	03:00	84	35,0	1,0	32,4	4,93	40	3,0										
	04:00	85	35,0	1,0	32,5	4,93	40	3,0										
	05:00	86	35,0	1,0	32,4	4,84	40	3,0										
	06:00	87	35,0	1,0	32,5	4,86	40	3,0										
	07:00	88	35,0	1,0	32,3	4,86	40	3,0										
	08:00	89	35,0	1,0	32,6	4,97	40	3,0					0,08	395,0	1800,0	42,0		
	09:00	90	35,0	1,0	32,5	4,88	40	3,0										
	10:00	91	35,0	1,0	32,5	4,98	40	3,0										
	11:00	92	35,0	1,0	32,4	4,98	40	3,0										
	12:00	93	35,0	1,0	32,5	5,08	40	3,0			3 л							
	13:00	94	35,0	1,0	32,5	4,93	40	3,0										
	14:00	95	35,0	1,0	32,5	4,95	40	3,0										
	15:00	96	35,0	1,0	32,5	4,96	40	3,0										
	16:00	97	34,0	1,0	32,5	4,95	40	3,0										

Продолжение таблицы 28

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фита за ед/мл	Белок мг/мл	Примечание	
											Угл	Цел	Дрож автол						
	17:00	98	34,0	1,0	32,5	4,94	40	3,0											
	18:00	99	37,0	1,0	32,4	4,86	40	3,0						0,21	378,0	1870,0	47,8		
	19:00	100	37,0	1,0	32,0	4,85	40	3,0											
	20:00	101	37,0	1,0	31,5	4,81	40	3,0											
	21:00	102	37,0	1,0	31,5	4,87	40	3,0											
	22:00	103	37,0	1,0	32,4	4,85	40	3,0											
	23:00	104	37,0	1,0	32,6	4,86	40	3,0											
17.11	00:00	105	37,0	1,0	32,4	4,81	40	3,0											
	01:00	106	37,0	1,0	32,3	4,80	40	3,0											
	02:00	107	37,0	1,0	32,4	4,84	40	3,0											
17.11	03:00	108	37,0	1,0	32,4	4,79	40	3,0											
	04:00	109	37,0	1,0	32,5	4,80	40	3,0											
	05:00	110	37,0	1,0	32,4	4,86	40	3,0											
	06:00	111	37,0	1,0	32,5	4,82	40	3,0											
	07:00	112	37,0	1,0	32,5	4,84	40	3,0											
	08:00	113	37,0	1,0	31,8	4,87	40	3,0						0,01	352,1	1990,0	50,4		



Продолжение таблицы 28

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фита за ед/мл	Белок мг/мл	Примечание	
											Угл	Цел	Дрож автол						
	09:00	114	37,0	1,0	32,1	4,84	40	3,0											
	10:00	115	37,0	1,0	32,3	4,83	40	3,0			3 л								
	11:00	116	37,0	1,0	32,5	4,83	40	3,0											
	12:00	117	37,0	1,0	32,0	4,80	40	3,0											
	13:00	118	37,0	1,0	32,5	4,93	40	3,0											
	14:00	119	37,0	1,0	32,5	4,81	40	3,0											
	15:00	120	37,0	1,0	32,1	4,81	40	3,0											
	16:00	121	37,0	1,0	32,5	4,82	40	3,0											
	17:00	122	37,0	1,0	32,4	4,80	40	3,0											
	18:00	123	37,0	1,0	32,2	4,81	40	3,0						1,8	355,0	2250,0	52,0		
	19:00	124	37,0	1,0	32,2	4,85	40	3,0											
	20:00	125	36,0	1,0	32,4	4,87	40	3,0											
	21:00	126	36,0	1,0	32,4	4,83	40	3,0											
	22:00	127	35,0	1,0	32,2	4,83	40	3,0											
	23:00	128	35,0	1,0	32,4	4,81	40	3,0											
18.11	00:00	129	35,0	1,0	32,3	4,82	40	3,0											
	01:00	130	34,0	1,0	32,5	4,85	40	3,0											
	02:00	131	34,0	1,0	32,4	4,82	40	3,0											
	03:00	132	32,0	1,0	32,4	4,81	40	3,0											
	04:00	133	32,0	1,0	32,5	4,81	40	3,0											
	05:00	134	32,0	1,0	32,4	4,80	40	3,0											

Продолжение таблицы 28

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фитаза ед/мл	Белок мг/мл	Примечание	
											Угл	Цел	Дрож авто л						
18.11	06:00	135	32,0	1,0	32,3	4,82	40	3,0											
	07:00	136	32,0	1,0	32,3	4,81	40	3,0											
	08:00	137	32,0	1,0	32,4	4,89	40	3,0					0,01	302,6	2510,0	54,0			
	09:00	138	32,0	1,0	32,3	4,87	40	3,0											
	10:00	139	32,0	1,0	32,2	4,86	40	3,0			3 л								
	11:00	140	32,0	1,0	32,0	4,85	40	3,0											
	12:00	141	32,0	1,0	32,2	4,82	40	3,0											
	13:00	142	32,0	1,0	32,0	4,81	40	3,0											
	14:00	143	32,0	1,0	32,4	4,81	40	3,0											
	15:00	144	32,0	1,0	32,2	4,85	40	3,0											
	16:00	145	32,0	1,0	32,2	4,83	40	3,0											
	17:00	146	32,0	1,0	32,2	4,83	40	3,0											
	18:00	147	32,0	1,0	32,3	4,83	40	3,0					0,01	275,0	2475,0	54,6			
	19:00	148	32,0	1,0	32,2	4,84	40	3,0											
	20:00	149	32,0	1,0	32,3	4,85	40	3,0											
	21:05		Ферментация завершена																

*1.2.16.2 Протокол ферментации №2 в V=50 л*

*Получение инокулята в лаборатории по существующей схеме (ферментация сравнения) (18-30.11.2021), таблица 29.*

Состав (г/л) и приготовление питательной среды

Глюкоза	25,0
Соевая мука	10,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15,0
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	5,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,3
CaCl <sub>2</sub>	0,23
Пеногаситель	0,5
<i>pH (исходный)</i>	<i>5,8-6,0</i>

Приготовили 5 л питательной среды: pH – 6,0 стерилизация: 1 атм., 121 °С, 60 мин  
Стерилизация 50 % р – ра глюкозы 0,5 атм (112°) 30 мин.

*Посевной материал*

18.11.2021г. Посев с пробирки (косяк) на колбу, V<sub>пс</sub>= 200 мл; время роста 47 часов.

21.11.2021г. Пересев из колбы в бутылку (5л ПС), при температуре (30±2)° С, 48 часов

ПС: стер pH= 5,76

Подготовка технологического оборудования и приготовление питательных сред и добавок велось так же как и в п 1.2.16.1.

Таблица 29 – Протокол технологического режима наработки культуральной жидкости *Penicillium verruculosum* в Ф-50л (№2)

Дата	Время	Ча сы ро ста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалк а %	Воздух , м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биома сса г/л	Фита за ед/мл	Белок мг/мл	Примечание
											Угл	Цел	Дрож автол					
24.11	15:00	Зас ев	35,0	1,0	31,5	5,05	10	2,0						3,2	217,0			
	16:00	1	35,0	1,0	31,7	5,11	10	2,0										
	17:00	2	35,0	1,0	31,7	5,12	10	2,0										
	18:00	3	35,0	1,0	31,4	5,15	10	2,0										
	19:00	4	35,0	1,0	31,5	5,17	10	2,0										
	20:00	5	35,0	1,0	31,6	5,18	10	2,0										
	21:00	6	35,0	1,0	31,6	5,19	10	2,0										
	22:00	7	35,0	1,0	31,5	5,20	20	2,0										
	23:00	8	35,0	1,0	31,6	5,20	30	2,0										
25.11	00:00	9	35,0	1,0	31,5	5,21	30	2,0										
	01:00	10	35,0	1,0	31,6	5,21	30	2,0										
	02:00	11	35,0	1,0	31,5	5,22	30	2,0										
	03:00	12	35,0	1,0	31,5	5,23	30	2,0										
	04:00	13	35,0	1,0	31,8	5,24	30	2,0										

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Ча сы ро ста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалк а %	Воздух , м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биома сса г/л	<b>Фита</b> за ед/мл	Бело к мг/м л	Примечание
											Угл	Цел	Дрож автол					
	05:00	14	35,0	1,0	32,5	5,25	30	2,0										
	06:00	15	35,0	1,0	31,9	5,26	30	2,0										
	07:00	16	35,0	1,0	31,6	5,27	30	2,0										
	08:00	17	35,0	1,0	32,1	5,28	30	2,0					2,4	248,0				
	09:00	18	35,0	1,0	31,5	5,29	30	2,0										
	10:00	19	35,0	1,0	31,7	5,30	30	2,0										
	11:00	20	35,0	1,0	31,5	5,33	30	2,0										
	12:00	21	35,0	1,0	31,8	5,36	30	2,0										
	13:00	22	35,0	1,0	31,5	5,38	30	2,0										
	14:00	23	35,0	1,0	31,8	5,37	30	2,0										
	15:00	24	35,0	1,0	31,2	5,21	30	2,0										
	16:00	25	35,0	1,0	31,9	5,15	30	2,0										
	17:00	26	35,0	1,0	32,0	4,98	30	2,0										

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Ча сы ро ста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалк а %	Воздух, м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биома сса г/л	Фитаз а ед/мл	Бело к мг/м л	Примечание
											Угл	Цел	Дро ж авто л					
25.11	18:00	27	35,0	1,0	32,4	4,95	30	2,0						1,2	470,0			
	19:00	28	35,0	1,0	32,3	4,82	30	2,0										
	20:00	29	34,0	1,0	32,5	4,95	30	2,0										
	21:00	30	34,0	1,0	32,5	4,86	40	3,0										
	22:00	31	34,0	1,0	32,5	4,95	40	3,0										
	23:00	32	34,0	1,0	32,5	4,88	40	3,0										
26.11	00:00	33	34,0	1,0	32,7	4,84	40	3,0										
	01:00	34	34,0	1,0	32,5	4,93	40	3,0										
	02:00	35	34,0	1,0	32,4	4,90	40	3,0										
	03:00	36	34,0	1,0	32,5	4,99	40	3,0										
	04:00	37	33,0	1,0	32,9	4,81	40	3,0										
	05:00	38	33,0	1,0	32,1	4,99	40	3,0										
	06:00	39	33,0	1,0	32,0	4,99	40	3,0										
	07:00	40	33,0	1,0	32,0	4,90	40	3,0										
	08:00	41	33,0	1,0	32,1	4,91	40	3,0						0,10	485,0			

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Ча сы ро ста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалк а %	Воздух, м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биома сса г/л	Фитаз а ед/мл	Бело к мг/м л	Примечание
											Угл	Цел	Дро ж авто л					
	09:00	42	33,0	1,0	32,6	5,01	40	3,0										
	10:00	43	34,0	1,0	32,1	5,00	40	3,0										
	11:00	44	34,0	1,0	32,2	5,05	40	3,0			<b>3 л</b>							
	12:00	45	34,0	1,0	32,2	4,83	40	3,0										
	13:00	46	34,0	1,0	32,2	4,90	40	3,0										
	14:00	47	34,0	1,0	32,5	4,92	40	3,0										
	15:00	48	34,0	1,0	32,4	4,91	40	3,0										
	16:00	49	34,0	1,0	32,1	4,95	40	3,0										
	17:00	50	34,0	1,0	32,0	4,94	40	3,0										
	18:00	51	34,0	1,0	32,0	4,92	40	3,0					1,3	425,8				
	19:00	52	33,0	1,0	32,2	4,99	40	3,0										
	20:00	53	33,0	1,0	32,1	4,94	40	3,0										

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Ча сы ро ста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалк а %	Воздух, м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биома сса г/л	Фитаз а ед/мл	Бело к мг/м л	Примечание
											Угл	Цел	Дро ж авто л					
26.11	21:00	54	33,0	1,0	32,3	4,80	40,0	3,0										
	22:00	55	33,0	1,0	32,5	4,90	40,0	3,0										
	23:00	56	33,0	1,0	32,1	4,91	40,0	3,0										
27.11	00:00	57	33,0	1,0	32,3	4,89	40,0	3,0										
	01:00	58	33,0	1,0	32,2	4,85	40,0	3,0										
	02:00	59	33,0	1,0	32,0	4,90	40,0	3,0										
	03:00	60	33,0	1,0	32,3	4,92	40,0	3,0										
	04:00	61	33,0	1,0	32,1	4,89	40,0	3,0										
	05:00	62	33,0	1,0	32,0	4,97	40,0	3,0										
	06:00	63	33,0	1,0	32,2	4,85	40,0	3,0										
	07:00	64	33,0	1,0	32,0	4,92	40,0	3,0										
	08:00	65	33,0	1,0	32,3	5,01	40,0	3,0					0,11	425,0				
	09:00	66	33,0	1,0	32,1	4,84	40,0	3,0										
	10:00	67	33,0	1,0	32,6	4,91	40,0	3,0										
	11:00	68	33,0	1,0	32,5	4,95	40,0	3,0				<b>3 л</b>						



Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Ча сы ро ста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалк а %	Воздух, м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биома сса г/л	Фитаз а ед/мл	Бело к мг/м л	Примечание
											Угл	Цел	Дро ж авто л					
	12:00	69	33,0	1,0	32,1	4,83	40,0	3,0										
	13:00	70	33,0	1,0	32,3	4,85	40,0	3,0										
	14:00	71	33,0	1,0	32,2	4,93	40,0	3,0										
	15:00	72	33,0	1,0	32,5	4,90	40,0	3,0										
	16:00	73	33,0	1,0	32,1	4,83	40,0	3,0										
	17:00	74	33,0	1,0	32,6	4,81	40,0	3,0										
	18:00	75	33,0	1,0	32,2	4,96	40,0	3,0					0,17	417,0	1300,0	30,3		
	19:00	76	33,0	1,0	32,3	4,95	40,0	3,0										
	20:00	77	35,0	1,0	32,5	4,91	40,0	3,0										
	21:00	78	35,0	1,0	32,1	4,92	40,0	3,0										
	22:00	79	35,0	1,0	32,0	4,85	40,0	3,0										
	23:00	80	35,0	1,0	32,0	4,94	40,0	3,0										

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Ча сы ро ста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалк а%	Воздух, м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биома сса г/л	Фитаза ед/мл	Белок мг/мл	Примечание	
											Угл	Цел	Дро ж авто л						
28.11	00:00	81	35,0	1,0	32,2	4,92	40	3,0											
	01:00	82	35,0	1,0	32,1	4,91	40	3,0											
	02:00	83	35,0	1,0	32,2	4,89	40	3,0											
	03:00	84	35,0	1,0	32,2	4,90	40	3,0											
	04:00	85	35,0	1,0	32,4	4,91	40	3,0											
	05:00	86	35,0	1,0	32,3	4,86	40	3,0											
	06:00	87	35,0	1,0	32,1	4,88	40	3,0											
	07:00	88	35,0	1,0	32,3	4,85	40	3,0											
	08:00	89	35,0	1,0	32,4	4,90	40	3,0					0,10	380,0	1720,0	39,0			
	09:00	90	35,0	1,0	32,4	4,89	40	3,0											
	10:00	91	35,0	1,0	32,6	4,92	40	3,0											
	11:00	92	35,0	1,0	32,3	4,91	40	3,0											
	12:00	93	35,0	1,0	32,1	5,00	40	3,0			<b>3 л</b>								
	13:00	94	35,0	1,0	32,2	4,95	40	3,0											
	14:00	95	35,0	1,0	32,4	4,99	40	3,0											
	15:00	96	35,0	1,0	32,4	4,91	40	3,0											

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фитаза ед/мл	Белок мг/мл	Примечание	
											Угл	Цел	Дрожавто л						
	16:00	97	34,0	1,0	32,6	4,95	40	3,0											
	17:00	98	34,0	1,0	32,2	4,96	40	3,0											
	18:00	99	37,0	1,0	32,6	4,89	40	3,0					0,21	378,0	1870,0	47,8			
	19:00	100	37,0	1,0	32,2	4,88	40	3,0											
	20:00	101	37,0	1,0	31,4	4,87	40	3,0											
	21:00	102	37,0	1,0	31,6	4,87	40	3,0											
	22:00	103	37,0	1,0	32,7	4,83	40	3,0											
	23:00	104	37,0	1,0	32,8	4,82	40	3,0											
29.11	00:00	105	37,0	1,0	32,3	4,80	40	3,0											
	01:00	106	37,0	1,0	32,2	4,99	40	3,0											
	02:00	107	37,0	1,0	32,2	4,95	40	3,0											

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фитаза ед/мл	Белок мг/мл	Примечание
											Угл	Цел	Дрожавто л					
29.11	03:00	108	37,0	1,0	32,4	4,82	40	3,0										
	04:00	109	37,0	1,0	32,5	4,80	40	3,0										
	05:00	110	37,0	1,0	32,4	4,98	40	3,0										
	06:00	111	37,0	1,0	32,5	4,82	40	3,0										
	07:00	112	37,0	1,0	32,5	4,80	40	3,0										
	08:00	113	37,0	1,0	31,8	4,95	40	3,0					0,01	323,0	1910,0	46,6		
	09:00	114	37,0	1,0	32,1	4,89	40	3,0										
	10:00	115	37,0	1,0	32,3	4,80	40	3,0			3 л							
	11:00	116	37,0	1,0	32,5	4,99	40	3,0										
	12:00	117	37,0	1,0	32,3	4,86	40	3,0										
	13:00	118	37,0	1,0	32,2	4,93	40	3,0										
	14:00	119	37,0	1,0	32,2	4,85	40	3,0										
	15:00	120	37,0	1,0	32,0	4,80	40	3,0										
	16:00	121	37,0	1,0	32,6	4,97	40	3,0										

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалка %	Воздух, м³/час	pO <sub>2</sub> %	pO <sub>2</sub> мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биомасса г/л	Фитаза ед/мл	Белок мг/мл	Примечание	
											Угл	Цел	Дрожавтол						
	17:00	122	37,0	1,0	32,8	4,83	40	3,0											
	18:00	123	37,0	1,0	32,1	4,80	40	3,0						1,5	369,0	2300,0	48,0		
	19:00	124	37,0	1,0	32,0	4,91	40	3,0											
	20:00	125	36,0	1,0	32,3	4,87	40	3,0											
	21:00	126	36,0	1,0	32,2	4,83	40	3,0											
	22:00	127	35,0	1,0	32,1	4,83	40	3,0											
	23:00	128	35,0	1,0	32,3	4,81	40	3,0											
30.11	00:00	129	35,0	1,0	32,0	4,82	40	3,0											
	01:00	130	34,0	1,0	32,1	4,85	40	3,0											
	02:00	131	34,0	1,0	32,2	4,82	40	3,0											
	03:00	132	32,0	1,0	32,0	4,80	40	3,0											
	04:00	133	32,0	1,0	32,6	4,89	40	3,0											
	05:00	134	32,0	1,0	32,5	4,85	40	3,0											

Продолжение таблицы 29

Дата	Время	Часы роста	V, л	P, бар	t, °C	pH	Мешалк а %	Воздух, м³/час	pO₂ %	pO₂ мг/л	Подпитка, л			РВ, %	Биома сса г/л	Фитаз а ед/мл	Бело к мг/м л	Примечание
											Угл	Цел	Дро ж авто л					
30.09	06:00	135	32,0	1,0	32,1	4,86	40	3,0										
	07:00	136	32,0	1,0	32,3	4,82	40	3,0										
	08:00	137	32,0	1,0	32,6	4,85	40	3,0				0,04	318,1	2450,0	52,4			
	09:00	138	32,0	1,0	32,8	4,81	40	3,0										
	10:00	139	32,0	1,0	32,4	4,89	40	3,0			3 л							
	11:00	140	32,0	1,0	32,6	4,95	40	3,0										
	12:00	141	32,0	1,0	32,1	4,94	40	3,0										
	13:00	142	32,0	1,0	32,5	4,88	40	3,0										
	14:00	143	32,0	1,0	32,6	4,83	40	3,0										
	15:00	144	32,0	1,0	32,1	4,81	40	3,0										
	16:00	145	32,0	1,0	32,0	4,89	40	3,0										
	17:00	146	32,0	1,0	32,3	4,80	40	3,0										
	18:00	147	32,0	1,0	32,1	4,81	40	3,0				0,09	260,0	2575,0	50,4			
	19:00	148	32,0	1,0	32,0	4,86	40	3,0										
	20:00	149	32,0	1,0	32,3	4,81	40	3,0										
	21:05		Ферментация завершена															

Как следует из результатов ферментации (Акты проведенных экспериментальных ферментаций (приложение Б) и протоколы №1 и №2, см выше) замена дрожжевого экстракта на соевую муку при приготовлении инокулята не повлияло на целевую фитазную активность в конечной точке ферментации (147 ч роста культуры). Ферментативные активности фитазы, определенные по ГОСТ 31487-2012, составили 2475 и 2575 ед/мл, соответственно. Данный результат позволяет использовать соевую муку как компонент инокуляционной среды при больших объемах культивирования.

Далее, отфильтрованную на нутч-филтре культуральную жидкость, пропустили через микрофилтрацию, высушили на распылительной сушке и определили удельные активности сухих ферментных препаратов, которые составили 25000 и 28000 ед фитазной активности на 1 г ферментного препарата. Концентрация белка составила 580 и 550 мг/г, соответственно.

1.2.17 Проведение опытной ферментации штамма *R. verruculosum* в ферментере V=10 м<sup>3</sup> с наработкой партии ферментных препаратов моно-фитазы

*1.2.17.1 Технологическая карта ферментации в товарном ферментере Ф-2/1 с исходным объемом 7400 л*

*Подготовка ферментеров Ф-2/1*

- Вымыть используемый ферментер Ф-2/1, воздухопровод к нему и трубопровод подачи к насосу Н-6 горячей водой, затем горячим раствором щелочи (75 °С) в циркуляционном режиме через систему СИП. Горячую воду сбросить через клапан №8 СИП в канализацию, а раствор щелочи вернуть в емкость СИП. После мойки щелочью необходимо произвести мойку горячей водой (использовать не менее 6 м<sup>3</sup>). Промывную воду сбросить через клапан №8 «слив в канализацию» в сток.

- Простерилизовать пустой используемой ферментер Ф-2/1, с заглушками вместо датчиков по следующему режиму:

Температура стерилизации: – 130 – 132°С.

Избыточное давление: – 0,22 – 0,24 МПа.

Время стерилизации: – 60 минут.

Пар подается в рубашки, через воздушный фильтр, в линию отходящих газов, во все линии коллектора для подпиток, пробоотборник и под донный клапан, при этом должен быть открыт донный клапан ферментера, поворотная заслонка слива в канализацию и слегка приоткрыт седельный вентиль для поддержания давления.

- Охладить до 32 – 33°С.

- Вымыть в дистиллированной или осмотической (подготовленной) воде используемый датчик рН (предварительно откалиброванный с помощью буферных растворов). Хорошо протереть его стеклянную часть спиртом и аккуратно вставить в Ф-2/1.

*Приготовление стартовой питательной среды в реакторе Р-4*

- Предварительно простерилизовать УНС-1 и отходящие трубопроводы. Стерилизацию осуществляют острым паром при температуре 132°C и избыточном давлении 0,22 МПа при стационарном температурном режиме не менее 30 минут.
- В вымытый реактор Р-4 (установка плотности должна быть 1,0) на 10000 л залить подготовленную горячую воду (50 – 60°C) в количестве 2000 л, затем включить мешалку и циркуляцию в реактор Р-4 через насос Н-2.
- Поочередно загрузить через штуцер на крышке реактора Р-4 расчетное количество компонентов. Компоненты загружать и стерилизовать при работающей мешалке.

*Состав стартовой среды, кг:*

Монофосфат калия	- 88
Сульфат аммония	- 66
Кальций хлористый пищевой	- 3,76
Магний сернокислый	- 3,76
Целлюлоза (МКЦ)	- 315
Пшеничные отруби	- 67,5
Дрожжевой автолизат	- 64,5
Пенегаситель	- 4

- В вымытый реактор Р-3 залить горячую воду в количестве 650 л и включить мешалку.
- При работающей мешалке, медленно внести пшеничные отруби в количестве 66 кг и дрожжевой автолизат 64,5 кг через штуцер на крышке Р-3. Выключить мешалку и все содержимое с помощью РПА-1 передать из Р-3 в реактор Р-4.
- В остаток суспензии в реакторе Р-3 после остановки по датчику сухого хода РПА-1 через СИП набрать 500 л холодной воды и перекачать ее с помощью РПА-1, также в Р-4.



- Выключить насос Н-2 и довести объем в Р-4 подготовленной горячей водой до 4000 литров.
  - Включаем мешалку в Р-4 и повышать температуру до 60°C. Выдерживать при данной температуре 30 минут (при постоянном перемешивании) с работающим насосом.
  - Затем подать раствор на стерилизацию в УНС-1 через насос Н-2 (уставка насоса 70%). Стерилизовать при температуре 125-130°C время выдерживания - 600 сек. Охладить стерильную питательную среду в УНС-1 до 80 °С.
  - При стерилизации 4000 л раствора подаем в используемый стерильный ферментер Ф-2/1.
  - Далее необходимо подать 450 л раствора патоки из Р-6/1 (предварительно простерилизовав линии подачи к Ф2/1,2) в Ф-2/1 .
  - Довести объем стартовой питательной среды (если это необходимо) в ферментере Ф-2/1 стерилизованной водой через УНС-1 (по режиму для стартовой среды) из реактора Р-4 до 7000 л. Контроль объема производить при выключенной мешалке по датчику уровня. Если при подаче воды из Р-4 температура стерилизации на УНС-1 будет меньше 130°C, то необходимо возвращать воду в реактор Р-4, а после выхода на стационарный режим стерилизации подавать через 10 минут в используемый ферментер Ф-2/1.
  - Охладить до 37°C.
  - Отобрать пробу на рН и сверить лабораторные значения с показателями рН в ферментере.
  - В автоматическом режиме довести рН в используемом ферментере Ф-2/1 аммиачной водой с концентрацией 23 – 24% до значения 5,5 из используемого реактора Т-1/2.
  - Выдержать 24 ч при температуре 37°C (давление не выше 0,4 бар; мешалка с 50% оборотами и аэрацией 100 м<sup>3</sup>/ч (обязательно с подачей оборотной воды в воздухоохладитель).
  - Простерилизовать в ферментере:
    - Температура стерилизации: – 112 – 115°C.
    - Избыточное давление: – 0,05 – 0,07 Мпа.
    - Время стерилизации: – 20 минут.
- Пар подается сначала в рубашки, а после достижения температуры  $\geq 100$  °С в линию отходящих газов, во все линии коллектора для подпиток, пробоотборник и через

воздушный фильтр, через сливной шаровой кран которого сначала обязательно сбрасывается конденсат, а потом сливной кран прикрывается.

- Охладить до 37°C.
- В автоматическом режиме довести рН в используемом ферментере Ф-2/1 аммиачной водой с концентрацией 23 – 24% до значения **5,0** из используемого реактора Т-1/2.
- Оставить до засева под давление (не выше 0,4 бар), мешалка 20%, без аэрации, поддерживать температуру 37°C.

#### *Подготовка к ферментации в ферментере Ф-2/1*

- Отбираем пробу на стерильность и пробу на рН для лаборатории. По результатам пробы на лабораторном рН-метре корректируем калибровку датчика рН на используемом ферментере Ф-2/1.

- Подаем максимальный расход воздуха на аэрацию ~ 400 м<sup>3</sup>/ч и выставляем обороты мешалки на 100%. После выхода на максимальный уровень концентрации рО<sub>2</sub> выставляем калибровку датчика рО<sub>2</sub> на 100%.

- Перед передачей инокулята необходимо простерилизовать линии от Ф-1/1,2 к Ф-2/1,2 (при стерилизации линии необходимо слегка приоткрыть все клапана, вентили и поворотные заслонки на отходящих от этой линии трубопроводах) по следующему режиму:

Температура стерилизации: – 135°C.

Время стерилизации: – 30 минут.

Затем охладить трубопровод до 35°C.

- Производим передачу инокулята из ферментера Ф-1/1 600 л в Ф/2/1, с помощью подачи сжатого воздуха, подняв в ферментере Ф-1/1 давление до 0,1 МПа.

#### *Режим ферментации в ферментере Ф-2/1*

Начальный объем: – 7400 л

Температура культивирования: – 32°C

Непрерывное перемешивание. Обороты мешалки регулируются в ручном режиме, уставка 100%.

рН: – начальный – 5,0 (уставка 4,9).

Давление: – 0,04 МПа.

Расход воздуха (аэрация): клапан открыт 100%

(при вспенивании кратковременно снизить подачу воздуха, снизить обороты мешалки и подать пеногаситель).

Время культивирования: – 120 – 144 часа.

Температура охлажденного воздуха должна быть не выше 30 °С

#### *Режим подачи подпиток в ферментеры*

- Первую порцию углеводной подпитки из реактора Р-6/1 необходимо внести в ферментер на 48 час роста (на основании лабораторного анализа РВ). Углеводная подпитка подается раз в сутки.

В ночную смену при повышении рН (выше 5,1) и кислорода (выше 35 %) необходимо внести раствор кислоты из реактора Т-2/2.

- На 72, 96, 120 час роста нужно подать целлюлозную подпитку из реактора Р-7/1 в количестве 300 л.

#### *Приготовление целлюлозной подпитки в реакторе Р-7/1*

- ✓ Вымыть реактор Р 7/1.
- ✓ Налить в Р7/1 800 л воды.
- ✓ Загрузить через штуцер на крышке реактора Р-7/1 при включенной мешалке расчетное количество целлюлозы, довести объем подготовленной горячей водой до 1000 литров.

Состав целлюлозной подпитки, кг:

Целлюлоза – 75

Вода – до объема 1000 л

- ✓ Стерилизовать при температуре 132°С, время выдерживания – 60 мин. Охладить до 37°С.

#### *Приготовление пеногасителя в реакторах Р-10/1,2*

- Предварительно вымыть и пропарить используемый реактор Р-10/1,2.
- Поместить 67 кг (67 л) пеногасителя из канистр в используемый реактор Р-10/1,2.
- Стерилизовать пеногаситель в используемом реакторе Р-10/1,2 при температуре 123 – 125°С и избыточном давлении 0,12 – 0,14 МПа в течение 30 минут.

### 1.2.17.2 Технологическая карта ферментации в инокуляторах 1 м<sup>3</sup> Ф-1/1 (посевные ферментеры)

#### Подготовка инокуляторов Ф-1/1

- Вымыть используемый инокулятор Ф-1/1 согласно инструкции по санитарной обработке емкостей и трубопроводов.

- Простерилизовать пустой используемый инокулятор Ф-1/1,2 с заглушками вместо датчиков по следующему режиму:

Температура стерилизации: – 130 – 132 °С;

Избыточное давление: – 0,22 – 0,24 МПа;

Время стерилизации: – 30 минут.

Пар подается в рубашки, через воздушный фильтр, в линию отходящих газов, линию подачи воды, пробоотборник и под донный клапан, при этом должен быть открыт донный клапан инокулятора, поворотная заслонка слива в канализацию и слегка приоткрыт седельный вентиль для поддержания давления.

- Вымыть в дистиллированной или осмотической (подготовленной) воде датчик рН, затем откалибровать его по буферным растворам и вставить в используемый инокулятор.

#### Приготовление питательной среды в инокуляторах Ф-1/1

- В используемый инокулятор Ф-1/1 заливаем 500 л воды и включаем мешалку.

- Через люк загружаем расчетное количество компонентов питательной среды.

Состав стартовой питательной среды, кг:

КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (монофосфат калия) – 12

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (сульфат аммония) – 4

MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O (магний сернокислый) – 0,24

CaCl<sub>2</sub> (кальций хлористый) – 0,24

**Соевая мука** – 8

Глюкоза – 12

Пенегаситель(лапрол) – 0,32

- Выключаем мешалку и доводим объем исходной питательной среды подготовленной водой до 800 л, контроль объема производим по датчику уровня.

- Включаем мешалку на 100 % и перемешиваем питательную среду в течение 15 минут.

- рН питательной среды доводим с помощью мембранного насоса раствором NaOH (5,8).

- Закрываем люк подачи компонентов питательной среды.

- Проводим первую стерилизацию питательной среды в инокуляторах Ф-1/1 одновременно со стерилизацией воздушного фильтра по следующему режиму:

Температура стерилизации: – 121 – 123 °С.

Избыточное давление: – 0,11 – 0,12 МПа.

Время стерилизации: – 20 минут.

Пар подается сначала в рубашки, а после достижения температуры  $\geq 100^{\circ}\text{C}$  в линию отходящих газов, линию подачи воды, пробоотборник и через воздушный фильтр, через сливной шаровой кран которого сначала обязательно сбрасывается конденсат, а потом сливной кран прикрывается.

- Охлаждаем простерилизованную питательную среду в используемом инокуляторе Ф-1/1 до 37 °С.

- Выдерживаем простерилизованную питательную среду в течение 24 ч под давлением не выше 0,3 бар, с аэрацией  $\sim 12 \text{ м}^3/\text{ч}$  (клапан открыт на 50%) и перемешиванием - 50%.

- Проводим повторную стерилизацию питательной среды в инокуляторах Ф-1/1 одновременно со стерилизацией воздушного фильтра по следующему режиму:

Температура стерилизации: – 112 – 115 °С.

Избыточное давление: – 0,05 – 0,07 Мпа.

Время стерилизации: – 20 минут.

Пар подается сначала в рубашки, а после достижения температуры  $\geq 100^{\circ}\text{C}$  в линию отходящих газов, линию подачи воды, пробоотборник и через воздушный фильтр, через сливной шаровой кран которого сначала обязательно сбрасывается конденсат, а потом сливной кран прикрывается.

- Охлаждаем простерилизованную питательную среду в используемом инокуляторе Ф-1/1 до 32°С.

- Оставить до засева под давлением не выше - 0,4 бар, мешалка - 20%, без аэрации, поддерживаем температуру 37 °С.

- Перед засевом отбираем пробу на стерильность и пробу на рН для лаборатории. По результатам пробы на лабораторном рН-метре корректируем калибровку датчика рН на используемом инокуляторе Ф-1/1.

- Проводим масштабирование, установив давление 0,4 бар и подавая максимальный расход воздуха на аэрацию. После выхода на максимальный уровень

концентрации  $pO_2$ , когда он больше не повышается, выставляем калибровку датчика  $pO_2$  на 100% (при наличии датчика  $pO_2$ ).

○ Производим стерильный засев используемого инокулятора Ф-1/1 посевным материалом из лаборатории в количестве 5 л, снизив давление в нем до минимума.

*Режим культивирования в инокуляторах Ф-1/1*

Начальный объем: – 805 л.

Температура культивирования: – 32 °С.

Непрерывное перемешивание. Обороты мешалки 100% (в ручном режиме)

рН: – начальный – 5,0.

Давление: – 0,05 МПа.

Расход воздуха (аэрация): ~ 32 м<sup>3</sup>/ч (клапан открыт на 100%)

Во время аэрации инокуляторов необходимо открывать пар в соответствующий теплообменник на линии отходящих газов

Время культивирования: – 24 – 48 часов.

Окончание ферментации определяется по изменению тенденции от снижения к стабильному (в течение 2-х часов) росту показаний датчика рН, а также визуально микробиологом.

По вышеуказанной схеме было проведено две наработки опытных образцов штамма *P.verruculosum* с получением ферментных препаратов моно-фитазы.

Следует отметить, что при ферментации в 10 куб ферментерах, в качестве последующих шагов очистки ФП используется процесс ультрафильтрации, при котором происходит концентрирование белка. Однако потребительские требования для кормового препараты фитазы составляют 5000 ед/г ФП. Поэтому, стандартной практикой является разбавление ферментного препарата крахмалом до требуемых значений и, соответственно, в Актах наработки опытных образцов представлены финальные (потребительские) значения удельной активности фитазы.

### 1.2.18 Создание генетической конструкции для продукции реннина в *O. Polymorpha*

Поскольку для продукции гетерологичных секретируемых белков часто требуется пользоваться разными организмами продуцентами, в наши задачи входило использование другого вида метилотрофных дрожжей, *Ogataea polymorpha*.

Поскольку штаммы *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*, продуцирующие реннин и альбумин, в ходе проекта будут подвергаться дальнейшим генетическим модификациям, при их конструировании требовалось предусмотреть сохранение удобных ауксотрофных генетических маркеров. Ряд векторов, имеющиеся в нашем распоряжении, которые будут использованы для получения таких модификаций содержат в качестве селективного маркера ген LEU2. Поэтому было запланировано, чтобы в штаммах, продуцирующих реннин и альбумин, сохранился ауксотрофный маркер *leu2*. Для этого будут использованы два подхода. В случае продуцента реннина в качестве реципиента будут использованы штаммы с двумя ауксотрофными маркерами *leu2* и *ade2*, а вектор экспрессии этого белка будет содержать ген ADE2 в качестве селективного маркера. Для альбумина будет использован штамм с мутацией *leu2* и нарушением гена TRP3 за счет интеграции гена LEU2. Экспрессионная кассета альбумина будет содержать фрагмент гена TRP3, рекомбинация которого с геномным локусом приведет к восстановлению этого гена и потере гена LEU2, в результате чего штамм снова станет ауксотрофным по лейцину и его можно будет использовать в дальнейшей работе в соответствии с целями проекта.

Для получения вектора экспрессии реннина для дрожжей *O. polymorpha* в качестве основы был взят вектор экспрессии для *Pichia pastoris* p23, содержащий в качестве селективного маркера ген HIS4. Чтобы заменить этот маркер на ген ADE2, вектор был гидролизован рестриктазами EcoRI и PvuII, после чего проведен электрофорез в агарозном геле и выделен фрагмент размером 5,6 т.п.н. В качестве источника гена ADE2 *O. parapolymorpha* использовали плазмиду pCHAD3, которую гидролизовали рестриктазами EcoRI и Ecl136II, после чего выделили фрагмент размером 2224 п.н. Выделенные фрагменты смешали с лигазным буфером и обработали ДНК лигазой. Лигазной смесью трансформировали штамм *Escherichia coli* DH5-альфа. Полученные колонии трансформантов вырастили в жидкой среде и из образцов полученной биомассы выделили плазмидную ДНК. На основании рестрикционного анализа были отобраны плазмидные клоны, в которых произошло замещение гена HIS4 *P. pastoris* на ген ADE2 *O. parapolymorpha*. Полученную плазмиду обозначили pAM962, рисунок 39.

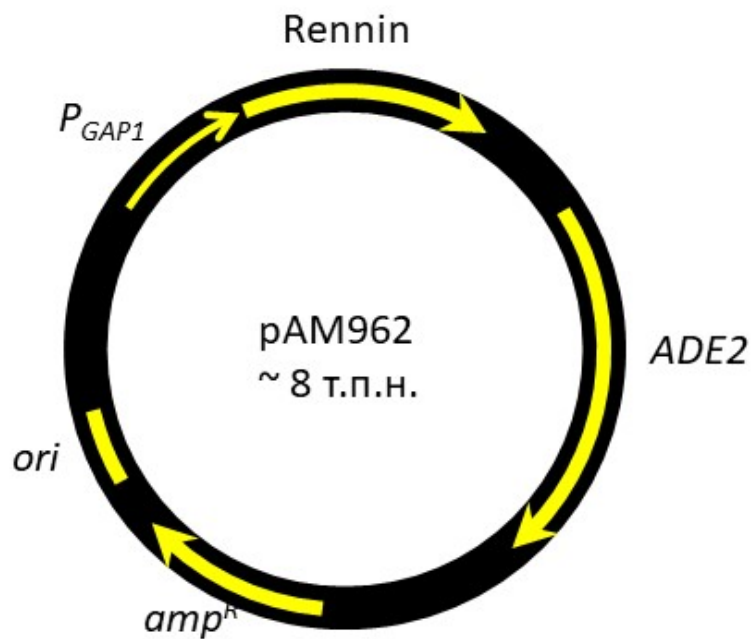


Рисунок 39 – Плазмида pAM962

1.2.19 Создание генетической конструкции для продукции человеческого альбумина в *O. Polymorpha*

Для получения вектора экспрессии альбумина для дрожжей *O. polymorpha* в качестве основы была использована плазмида pAM907, содержащая промотор гена MOX и фрагмент гена TRP3 *O. polymorpha*. Синтез гена, кодирующего альбумин, с оптимизированным для *O. polymorpha* кодоновым составом был заказан у компании Genscript. Этот ген был клонирован в бактериальном векторе и фланкирован рестрикционными сайтами EcoRV и BglII. Плазмида с геном альбумина была гидролизована этими рестриктазами, после чего проведен электрофорез и выделен фрагмент размером 1841 п.н. Плазмида pAM907 была гидролизована рестриктазами BglII и ScaI. Полученные фрагменты ДНК были разделены электрофоретически и выделен фрагмент размером 4376 п.н. Этот фрагмент был смешан с фрагментом, несущим ген альбумина, произведена обработка ДНК лигазой в лигазном буфере. Лигазной смесью трансформировали штамм *Escherichia coli* DH5-альфа. Полученные колонии трансформантов вырастили в жидкой среде и из образцов полученной биомассы выделили



плазмидную ДНК. На основании рестрикционного анализа были отобраны плазмидные клоны, в которых содержался ген, кодирующий альбумин. Правильность стыковки промотора и кодирующей части гена альбумина была подтверждена после определения последовательности нуклеотидов этого участка плазмиды. Полученную плазмиду обозначили рАМ952, рисунок 40.

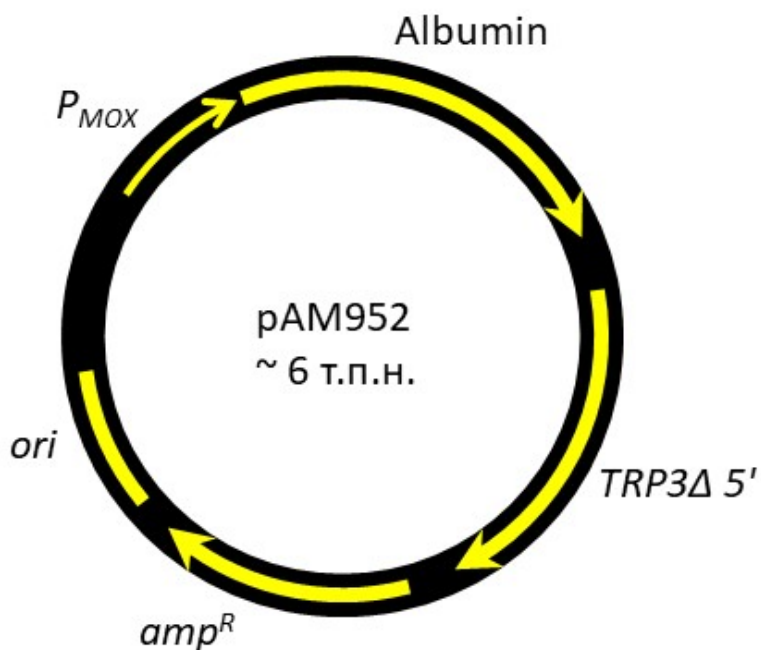


Рисунок 40 – Плазмида рАМ952

### **1.3 Мероприятия по подготовке высококвалифицированных кадров по направления реализации Федеральной программы**

1.3.1 Организация научной стажировки для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет

В задачу работы входила организация научной стажировки для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет с целью выполнения работ, связанных с будущей профессиональной деятельностью и направленных на формирование, закрепление, развитие практических навыков и компетенций по направлениям исследовательской программы (проекта) по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» в профильных подразделениях биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

В состав работ по организации стажировки входила разработка Положения о научной стажировке для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет (Приложение В) и принятие Ученым советом решения по существу рассмотрения Положения о научной стажировке (решение Ученого совета от 25 ноября 2021 года, Приложение В).

В последнее десятилетие наблюдается взрывной рост количества работ в инновационной области генетических исследований «геномное редактирование». По результатам поиска публикаций в базе PUBMED на 15.12.2021 года в период с 1977 по 2021 год по ключевым словам «genome editing» найдено 24593 работы, причем подавляющее количество из них (22229) опубликованы за последние 10 лет.

В разработанную программу стажировки (Приложение В) входит: рассмотрение теоретических основ методов редактирования геномов, принципов работы таких систем редактирования как ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9; методов прецизионной и направленной модификации бактериальной хромосомы, а также конструирования рекомбинантных плазмид; современное использование CRISPR/Cas в метаболической инженерии; применение системы редактирования CRISPR/CAS9 для модификации геномов сельскохозяйственных растений и другие аспекты геномного редактирования. Теоретическая часть стажировки включает элементы лекционных и семинарских занятий, работу с современной научной литературой, консультации по последним достижениям геномного редактирования в биотехнологии и сельском хозяйстве, которые проводятся преподавателями биологического факультета МГУ. Практическая часть стажировки включает демонстрационную практическую задачу.

Участникам, освоившим в полном объеме программу научной стажировки по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий», выдаются свидетельства/сертификаты.

В соответствии с представленным ФИЦ Биотехнологии РАН списком кандидатур для участия в стажировке из числа молодых исследователей исследовательской программы в возрасте до 39 лет Приказом по биологическому факультету МГУ от «2» декабря 2021 года (Приложение В) за подписью заместителя декана А.М.Рубцова 10 молодых исследователей из ФИЦ Биотехнологии РАН допущены к участию в стажировке по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий».

На отчетном этапе научная стажировка проводилась с 6 по 10 декабря 2021 года, общей длительностью 40 академических часов, включая 24 академических часа аудиторных работ, 16 академических часов практических занятий. Руководителем научной стажировки назначена д.б.н. Страховская М.Г.

Разработанный к научной стажировке демонстрационный материал для теоретических занятий приведен в Приложении В. Преподаватели: профессор, д.б.н. Машко С.В., профессор, д.б.н. Кочиева Е.З., д.ф.-м.н. Шайтан А.К.

Практические занятия включали выполнение экспериментальной работы «Основы трансформации бактерий, проверка компетентности клеток, оценка эффективности трансфекции».

Краткое описание практической работы.

Цель работы: научиться проводить трансфекцию плазмиды в клетку, оценивать компетентность клеток и эффективность трансфекции, скорость наработки белка. Задача работы состоит в обучении практическим основам трансформации бактерий. Участники стажировки трансфицировали в бактерию плазмиду, содержащую красный флюоресцентный белок. Необходимо было оценить эффективность трансфекции, а также скорость наработки бактериями белка. Описание проведения практической задачи по дням приведены в Приложении В. Преподаватели: д.ф.-м.н. Шайтан А.К., к.ф.-м.н. Армеев Г.А., Карлова М.Г.

По итогам прохождения стажировки участникам стажировки выданы свидетельства на бланке биологического факультета МГУ. Копии выданных свидетельств приведены в Приложении В.

1.3.2 Организация регулярного научно-практического семинара для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет по тематике исследовательской программы

*Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова*

В задачу работы входила организация регулярного научно-практического семинара для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет по тематике исследовательской программы. На 2021 год запланировано проведение 1 заседания научно-практического семинара.

Разработана структура программы научно-практического семинара «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» в рамках мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий.

Программы заседаний регулярного научно-практического семинара в 2021-2023 гг будут построены таким образом, чтобы систематизировать у участников знания по теоретическим основам методов редактирования генома, информировать о проводимых в рамках Проекта исследованиях, ознакомить с возможностями, структурой и принципами организации производственного процесса на современном биотехнологическом предприятии, показать преимущества интеграции фундаментальных и прикладных наук и реального сектора экономики на примере консорциума ФИЦ Биотехнологии РАН, МГУ имени М.В.Ломоносова, ВГУИТ и ООО «Агрофермент».

Место проведения семинара – Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 12, биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, кафедра синтетической биологии, аудитория 208.

Формат проведения семинара – смешанный, предусматривает очное участие и подключение докладчиков и участников по видеосвязи.

Участниками семинара являются студенты биологического факультета МГУ и ВГУИТ, аспиранты и молодые исследователи ФИЦ Биотехнологии РАН, биологического факультета МГУ и ВГУИТ.

С целью популяризации итогов исследований по Проекту и мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий не позднее трех месяцев с даты проведения семинара записи выборочных выступлений участников семинара будут размещаться в сети Интернет на сайте кафедры синтетической биологии [syn.bio.msu.ru](http://syn.bio.msu.ru).

За 14 дней до заседания издается распоряжение заместителя декана биологического факультета МГУ о проведении научно-практического семинара, назначается

ответственный за проведение семинара и лицо, контролирующее исполнение распоряжения, из числа сотрудников биологического факультета МГУ.

По итогам проведения семинара составляется отчет.

Отчет о проведении научно-практического семинара «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» в рамках мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий 15 октября 2021 года

Распоряжением от 1 декабря 2021 года №20 (Приложение В) за подписью заместителя декана биологического факультета МГУ А.М.Рубцова о проведении научно-практического семинара 15 октября 2021 года ответственным за организацию семинара назначена д.б.н. М.Г.Страховская.

На заседании 15 декабря 2021 года программа научно-практического семинара «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» включала 6 докладов ведущих специалистов в области геномного редактирования и биотехнологий. Выступили академик РАН Попов В.О., профессора Машко С.В. и Сеницын А.П., кандидаты наук Александров А.И. и Ошкин И.Ю., заместитель директора ООО «Агрофермент» Кержнер М.А.

Программа семинара с названиями докладов приведена в Приложении В.

Участие в научно-практическом семинаре «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» 15 декабря 2021 года приняли 26 студентов и аспирантов в возрасте до 39 лет из МГУ имени М.В.Ломоносова, ВГУИТ и ФИЦ Биотехнологии РАН.

Список участников семинара, материалы докладов приведены в отчете о научно-практическом семинаре в приложении В.

#### *Воронежский Государственный Университет Инженерных Технологий*

В соответствии с планом-графиком по выполнению составной части исследовательской программы по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» на первом этапе ФГБОУ ВО «ВГУИТ» организовал и провел 03.12.2021г. регулярный научно-практический семинар для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет «Перспективы применения геномного редактирования в промышленных и пищевых биотехнологиях». На рисунке 41 представлен анонс семинара на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ».

The screenshot shows the website of Voronezh State University of Engineering Technologies (VSEI). The header includes navigation links: СВЕДЕНИЯ ОБ ОО, ОБУЧЕНИЕ, НАУКА, ВНЕУЧЕБНАЯ ЖИЗНЬ, INTERNATIONAL, and КОНТАКТЫ. The main navigation bar lists categories: АБИТУРИЕНТУ, СТУДЕНТУ, АСПИРАНТУ, СОТРУДНИКАМ, ПАРТНЕРАМ, and ВЫПУСКНИКАМ. The main content area features a prominent announcement titled "Приглашаем Вас принять участие в работе научно-практического семинара «Перспективы применения геномного редактирования в промышленных и пищевых биотехнологиях»". The announcement is dated 02 декабря 2021 and has 288 views. It addresses colleagues and invites them to participate in a seminar on genome editing, which is part of a federal program for genetic technology development. The seminar is scheduled for December 3, 2021, at the VSEI. Contact information for the organizing department is provided.

Рисунок 41 – Официальное приглашение принять участие в научно-исследовательском семинаре «Перспективы применения геномного редактирования в промышленных и пищевых биотехнологиях»

Распоряжение ректора о проведении научного семинара представлено в Приложении В.

Научно-практический семинар «Перспективы применения геномного редактирования в промышленных и пищевых биотехнологиях» был посвящен актуальным вопросам развития биотехнологий, биоинженерии и биоинформатики. Также на семинаре обсудили планы реализации проекта «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, в котором принимает участие ФГБОУ ВО «ВГУИТ» в сотрудничестве с ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ФГБОУ ВО «МГУ» и ООО «Агрофермент». Была освещена роль университета в данном проекте, на чьей базе будут разрабатываться и внедряться новые образовательные программы «Редактирование геномов: актуальные задачи и технологии», «Биоинженерия в современных пищевых технологиях» и «Практические подходы геномного редактирования для пищевой биотехнологии», а также проводиться регулярные научные семинары, конференции и школы для молодых исследователей, посвященные прикладным генетическим и биоинженерным технологиям и перспективам их внедрения на производствах пищевой

промышленности. Кроме того, в семинаре приняли участие заинтересованные в сотрудничестве с ФГБОУ ВО «ВГУИТ» биотехнологические предприятия, которые рассказали о возможностях прохождения практик и карьерных перспективах для студентов и выпускников.

В программе научно-практического семинара «Перспективы применения геномного редактирования в промышленных и пищевых биотехнологиях» было заявлено выступление восьми спикеров, в том числе ректора Попова Василия Николаевича с приветственным словом, двух сотрудников кафедры биохимии и биотехнологий: к.т.н. Ожерельевой Ольги Николаевны с докладом «Биотехнологии – процессы и перспективы применения» (Приложение В) и Толкачевой Анны Александровны с докладом «Фукоолигосахариды водорослей *Fucus vesiculosus* проявляют фунгистатическую и фунгицидную активность в отношении ихтиопаразита *Saprolegnia parasitica*» (Приложение В) и двух младших научных сотрудников лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий ФГБОУ ВО «ВГУИТ»: Грязновой Марии Владимировны с презентацией лаборатории (видео в Приложении В) и Дворецкой Юлии Дмитриевны с докладом «Биоинформатические ключи и базы данных для успешного геномного редактирования» (Приложение В). Также в семинаре приняли участие заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией Молекулярной генетики ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н. Александров Александр Иванович с докладом о реализации мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» (Приложение В), заместитель директора по качеству ООО «Агрофермент» Кержнер Максим Александрович с презентацией предприятия, и руководитель образовательных проектов АО «Генериум» Семихина Анастасия Олеговна с презентацией компании (видео в Приложении В). Общая длительность семинара составила около двух часов, в завершении была проведена дискуссия и подведение общих итогов семинара. Программа научно-практического семинара представлена в Приложении В.

В общей сложности в семинаре приняло участие 61 человек, из них 19 преподавателей и научных сотрудников ФГБОУ ВО «ВГУИТ», 33 студента, обучающихся по направлениям биотехнология; биоинженерия и биоинформатика, а также 5 приглашенных участников, присоединившихся к семинару в онлайн-формате. Список участников научно-исследовательского семинара совместно с программой доступны на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» в разделе «Наука», «Конференции»

(<http://old.vsuet.ru/science/conference.asp>), также Приложение В содержит явочный лист участников семинара, с их подписями.

На семинаре присутствовала пресс-служба ФГБОУ ВО «ВГУИТ», которая по результатам конференции написала новостную заметку с фотоотчетом, опубликованную на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» в разделе «Новости» (<https://vsuet.ru/news/vovguitproshelnauchno-prakticheskijseminar>). На всем протяжении семинара велась запись видеоконференции, которая доступна по ссылке (<https://drive.google.com/file/d/1reYbmgalt8N96RfyI0zGKPz6FEW97BXY/view?usp=sharing>), а также которая будет передана с остальной отчетной документацией по проекту. В ПРИЛОЖЕНИИ В приложен скриншот новостной заметки о проведенном научно-практическом семинаре с официального сайта ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Фотоотчет с семинара находится в ПРИЛОЖЕНИИ В.

В ходе выполнения работ по подготовке высококвалифицированных кадров по направлениям реализации Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы:

организована и проведена научная стажировка по теме ««Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий», в ходе которой 10 молодых исследователей в возрасте до 39 лет из ФИЦ Биотехнологии РАН прошли стажировку на биологическом факультете МГУ имени М.В.Ломоносова, направленной на формирование, закрепление, развитие практических навыков и компетенций по направлениям исследовательской программы;

организован регулярный научно-практический семинар для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет по теме ««Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» и проведено заседание, в котором участвовало 26 студентов и аспирантов в возрасте до 39 лет из МГУ имени М.В.Ломоносова, ВГУИТ и ФИЦ Биотехнологии РАН.

В отчете представлены результаты первого этапа исследовательского проекта по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий», выполненных по Соглашению от 28 сентября 2021 года № 075-15-2021-1071 в рамках мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы, утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 22 апреля 2019 г. № 479.

В результате выполнения первого (промежуточного этапа) «Мероприятия по подготовке высококвалифицированных кадров по направлениям реализации Федеральной



программы», подразумевающего работы по организации и проведению научных конференций и школ для исследователей в возрасте до 39 лет, подготовлен отчет о проведенном научно-практическом семинаре «Перспективы применения геномного редактирования в промышленных и пищевых биотехнологиях» для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет по тематике исследовательской программы, включающий анализ научной литературы, а также разработанную программу научно-практического семинара, распоряжение о проведении научного семинара, списки участников семинара и фотоотчет о проведенном мероприятии, которые расположены в приложениях к данному отчету. Выполнен п. 1.1 Технического задания.

В целом, основной итог работ, проведенных в ходе реализации первого этапа, заключается в том, что на базе ФГБОУ ВО «ВГУИТ» создан задел для дальнейшей разработки и внедрения новых образовательных программ: «Редактирование геномов: актуальные задачи и технологии», «Биоинженерия в современных пищевых технологиях», «Практические подходы геномного редактирования для пищевой биотехнологии», а также программы повышения квалификации «Применение геномного редактирования и генетической инженерии в пищевых технологиях»; проведения регулярного научно-практического семинара, а также научно-практических конференций и школ для студентов и молодых исследователей в возрасте до 39 лет, которые направлены на успешную подготовку высококвалифицированных кадров в области биотехнологий. Налажен диалог с организациями-партнерами, на базе которых будут проходить стажировки студентов, а также которые заинтересованы в трудоустройстве на своих предприятиях выпускников ВУЗа, освоивших вышеперечисленные образовательные программы.

Задачи, поставленные на первом отчетном этапе, решены в полном объеме.

Сведения о ходе выполнения проекта размещены на официальном сайте ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» по адресу <https://vsuet.ru/science/results-nir>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного этапа работы начаты работы по всем запланированным направлениям, с выполнением всех поставленных задач. Созданы конструкции для модификации штаммов и для создания продуцентов на основе различных видов дрожжей. Созданы штаммы и проведены первые раунды пилотирования технологии производства ферментанных препаратов. Начаты работы по приспособлению метанотрофных штаммов бактерий для использования их в качестве источника кормового белка и платформы для получения других важных биотехнологических продуктов.

Создана новая инфраструктура в лице центра микробной ферментации, компетенции и оснащение которого необходимы для решения задач проекта. Также разработана часть плана по ее дальнейшему развитию. Проведены стажировки участников научной программы и запущены регулярные семинары, которые позволят заинтересовать студентов и молодых ученых в развитии генетических технологий.

На основании проделанной работы можно сделать вывод, что все запланированные на данный этап работы выполнены в полном объеме, что позволяет продолжать выполнение проекта в плановом режиме.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. 5S rRNA Promoter for Guide RNA Expression Enabled Highly Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing in *Aspergillus niger* / X. Zheng, P. Zheng, K. Zhang [et al.] // *ACS synthetic biology*. – 2019. – Vol. 8. – № 7. – P. 1568-1574.
2. A CRISPR/Cas9 method facilitates efficient oligo-mediated gene editing in *Debaryomyces hansenii* / T. Strucko, N. L. Andersen, M. R. Mahler [et al.] // *Synthetic biology (Oxford, England)*. – 2021. – Vol. 6. – № 1.
3. A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Shi, Y. Liang, M. M. Zhang [et al.] // *Metabolic engineering*. – 2016. – Vol. 33. – P. 19-27.
4. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity / M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara [et al.] // *Science*. – 2012. – Vol. 337. – № 6096. – P. 816-821.
5. A Stable, Autonomously Replicating Plasmid Vector Containing *Pichia pastoris* Centromeric DNA / Y. Nakamura, T. Nishi, R. Noguchi [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 2018. – Vol. 84. – № 15.
6. A Toolbox of Diverse Promoters Related to Methanol Utilization: Functionally Verified Parts for Heterologous Pathway Expression in *Pichia pastoris* / T. Vogl, L. Sturmberger, T. Kickenweiz [et al.] // *ACS synthetic biology*. – 2016. – Vol. 5. – № 2. – P. 172-186.
7. Aleksenko A. The plasmid replicator AMA1 in *Aspergillus nidulans* is an inverted duplication of a low-copy-number dispersed genomic repeat / A. Aleksenko, A. J. Clutterbuck // *Molecular microbiology*. – 1996. – Vol. 19. – № 3. – P. 565-574.
8. Alit H. Development and validation of promoter-probe vectors for the study of methane monooxygenase gene expression in *Methylococcus capsulatus* Bath / H. Alit, J. C. Murrell // *Microbiology (Reading, England)*. – 2009. – Vol. 155. – № Pt 3. – P. 761-771.
9. Aslanidis C. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR) / C. Aslanidis, P. J. de Jong // *Nucleic acids research*. – 1990. – Vol. 18. – № 20. – P. 6069-6074.
10. Auto-induction of *Pichia pastoris* AOX1 promoter for membrane protein expression / J. Y. Lee, H. Chen, A. Liu [et al.] // *Protein expression and purification*. – 2017. – Vol. 137. – P. 7-12.
11. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties / M. Wyss, R. Brugger, A. Kronenberger [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 1999. – Vol. 65. – № 2. – P. 367-373.
12. Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium / C. A. Henard, H. Smith, N. Dowe [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6.
13. Biot-Pelletier D. Seamless site-directed mutagenesis of the *Saccharomyces cerevisiae*

- genome using CRISPR-Cas9 / D. Biot-Pelletier, V. J. J. Martin // *Journal of biological engineering*. – 2016. – Vol. 10. – № 1.
14. Budisa N. Residue-specific global fluorination of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* / N. Budisa, W. Wenger, B. Wiltschi // *Molecular bioSystems*. – 2010. – Vol. 6. – № 9. – P. 1630-1639.
  15. Caspers M. Lou. Natural pH gradients formed by amino acids: Ampholyte distribution, time course, use in electrofocusing of protein, relation to pH gradients in isotachopheresis, and separator effects / M. Lou Caspers, A. Chrambach // *Analytical Biochemistry*. – 1977. – Vol. 81. – № 1. – P. 28-39.
  16. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities / S. Golovan, G. Wang, J. Zhang, C. W. Forsberg // *Canadian journal of microbiology*. – 2000. – Vol. 46. – № 1. – P. 59-71.
  17. Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from *Methylococcus capsulatus* Bath / A. S. Reshetnikov, O. N. Rozova, V. N. Khmelenina [et al.] // *FEMS microbiology letters*. – 2008. – Vol. 288. – № 2. – P. 202-210.
  18. Chiruvolu V. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations / V. Chiruvolu, J. M. Cregg, M. M. Meagher // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1997. – Vol. 21. – № 4. – P. 277-283.
  19. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing / K. Labun, T. G. Montague, M. Krause [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2019. – Vol. 47. – № W1. – P. W171-W174.
  20. Classical genetic manipulation / J. M. Cregg, S. Shen, M. Johnson, H. R. Waterham // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. – 1998. – Vol. 103. – P. 17-26.
  21. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* / A. Weninger, A. M. Hatzl, C. Schmid [et al.] // *Journal of biotechnology*. – 2016. – Vol. 235. – P. 139-149.
  22. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates / L. F. Martins, D. Kolling, M. Camassola [et al.] // *Bioresource technology*. – 2008. – Vol. 99. – № 5. – P. 1417-1424.
  23. Construction of a series of episomal plasmids and their application in the development of an efficient CRISPR/Cas9 system in *Pichia pastoris* / Y. Gu, J. Gao, M. Cao [et al.] // *World journal of microbiology & biotechnology*. – 2019. – Vol. 35. – № 6.
  24. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes / L. A. Gilbert, M. H. Larson, L. Morsut [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 154. – № 2. – P. 442.

25. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Penicillium oxalicum* and *Trichoderma reesei* using 5S rRNA promoter-driven guide RNAs / Q. Wang, Q. Zhao, Q. Liu [et al.] // *Biotechnology letters*. – 2021. – Vol. 43. – № 2. – P. 495-502.
26. CRISPR/Cas9-Mediated Homology-Directed Genome Editing in *Pichia pastoris* / T. Gassler, L. Heisting, D. Mattanovich [et al.] // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2019. – Vol. 1923. – P. 211-225.
27. CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae* / R. Mans, H. M. van Rossum, M. Wijsman [et al.] // *FEMS yeast research*. – 2015. – Vol. 15. – № 2. – P. 1-15.
28. CRISPR/Cas9 System as a Valuable Genome Editing Tool for Wine Yeasts with Application to Decrease Urea Production / I. Vigentini, M. Gebbia, A. Belotti [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – № NOV.
29. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau [et al.] // *Science* (New York, N.Y.). – 2007. – Vol. 315. – № 5819. – P. 1709-1712.
30. Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology / L. Näätäsaari, B. Mistlberger, C. Ruth [et al.] // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – № 6.
31. Efficient CRISPR-Cas9 mediated multiplex genome editing in yeasts / L. Wang, A. Deng, Y. Zhang [et al.] // *Biotechnology for biofuels*. – 2018. – Vol. 11. – № 1.
32. Efficient Multiplexed Integration of Synergistic Alleles and Metabolic Pathways in Yeasts via CRISPR-Cas / A. A. Horwitz, J. M. Walter, M. G. Schubert [et al.] // *Cell Systems*. – 2015. – Vol. 1. – № 1. – P. 88-96.
33. Efficient production of transgenic chickens based on piggyBac / X. Liu, N. Li, X. Hu [et al.] // *Transgenic research*. – 2013. – Vol. 22. – № 2. – P. 417-423.
34. Endogenous signal peptides efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris* / S. Liang, C. Li, Y. Ye, Y. Lin // *Biotechnology letters*. – 2013. – Vol. 35. – № 1. – P. 97-105.
35. Engineered CRISPR/Cas9 system for multiplex genome engineering of polyploid industrial yeast strains / J. Lian, Z. Bao, S. Hu, H. Zhao // *Biotechnology and bioengineering*. – 2018. – Vol. 115. – № 6. – P. 1630-1635.
36. Engineering Robust Cellulases for Tailored Lignocellulosic Degradation Cocktails / F. Contreras, S. Pramanik, A. M. Rozhkova [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 5.
37. Ergün B. G. Hybrid-architected promoter design to engineer expression in yeast / B. G.

- Ergün, P. Çalık // *Methods in enzymology*. – 2021. – Vol. 660. – P. 81-104.
38. Expanding Characterized Diversity and the Pool of Complete Genome Sequences of *Methylococcus* Species, the Bacteria of High Environmental and Biotechnological Relevance / I. Y. Oshkin, O. V. Danilova, S. Y. But [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – Vol. 12.
39. Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers / A. Weninger, J. E. Fischer, H. Raschmanová [et al.] // *Journal of cellular biochemistry*. – 2018. – Vol. 119. – № 4. – P. 3183-3198.
40. Expression of CAS9 Nuclease of the CRISPR/Cas Genome Editing System in the Filamentous Fungus *Penicillium verruculosum* / V. Y. Kislitsin, A. M. Chulkin, I. G. Sinelnikov [et al.] // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2020. – Vol. 75. – № 4. – P. 243-249.
41. Farzadfard F. Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas / F. Farzadfard, S. D. Perli, T. K. Lu // *ACS synthetic biology*. – 2013. – Vol. 2. – № 10. – P. 604-613.
42. Fhl1p protein, a positive transcription factor in *Pichia pastoris*, enhances the expression of recombinant proteins / X. Zheng, Y. Zhang, X. Zhang [et al.] // *Microbial cell factories*. – 2019. – Vol. 18. – № 1.
43. Fine-Tuning of Transcription in *Pichia pastoris* Using dCas9 and RNA Scaffolds / M. Baumschabl, R. Prielhofer, D. Mattanovich, M. G. Steiger // *ACS synthetic biology*. – 2020. – Vol. 9. – № 12. – P. 3202-3209.
44. Genetic tools for the industrially promising methanotroph *Methylobacterium buryatense* / A. W. Puri, S. Owen, F. Chu [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 2015. – Vol. 81. – № 5. – P. 1775-1781.
45. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris* / K. De Schutter, Y. C. Lin, P. Tiels [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2009. – Vol. 27. – № 6. – P. 561-566.
46. GoldenPiCS: a Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris* / R. Prielhofer, J. J. Barrero, S. Steuer [et al.] // *BMC systems biology*. – 2017. – Vol. 11. – № 1.
47. Gusakov A. V. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass / A. V. Gusakov, A. P. Sinitsyn // <http://dx.doi.org/10.4155/bfs.12.41>. – 2014. – Vol. 3. – № 4. – P. 463-477.
48. Hartmann T. The oxygen-tolerant and NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is able to catalyze the reduction of CO<sub>2</sub> to formate / T. Hartmann, S. Leimkühler // *The FEBS journal*. – 2013. – Vol. 280. – № 23. – P. 6083-6096.
49. Henard C. A. Phosphoketolase overexpression increases biomass and lipid yield from

methane in an obligate methanotrophic biocatalyst / C. A. Henard, H. K. Smith, M. T. Guarnieri // *Metabolic engineering*. – 2017. – Vol. 41. – P. 152-158.

50. High efficiency CRISPR/Cas9 genome editing system with an eliminable episomal sgRNA plasmid in *Pichia pastoris* / Y. Yang, G. Liu, X. Chen [et al.] // *Enzyme and microbial technology*. – 2020. – Vol. 138.

51. Homologous expression of soluble methane monooxygenase genes in *Methylophilus trichosporium* OB3b / J. S. Lloyd, R. Finch, H. Dalton, J. C. Murrell // *Microbiology (Reading, England)*. – 1999. – Vol. 145 ( Pt 2). – № 2. – P. 461-470.

52. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* / Z. Bao, H. Xiao, J. Liang [et al.] // *ACS synthetic biology*. – 2015. – Vol. 4. – № 5. – P. 585-594.

53. Hydrophobin signal sequence mediates efficient secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris* / K. Kottmeier, K. Ostermann, T. Bley, G. Rödel // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2011. – Vol. 91. – № 1. – P. 133-141.

54. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus* / T. H. Tang, J. P. Bachellerie, T. Rozhdetsvensky [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Vol. 99. – № 11. – P. 7536-7541.

55. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes / R. Jansen, J. D. A. Van Embden, W. Gastra, L. M. Schouls // *Molecular microbiology*. – 2002. – Vol. 43. – № 6. – P. 1565-1575.

56. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene / A. Y. Aleksenko, N. A. Makarova, I. V. Nikolaev, A. J. Clutterbuck // *Current genetics*. – 1995. – Vol. 28. – № 5. – P. 474-477.

57. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements / F. J. M. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, E. Soria // *Journal of Molecular Evolution*. – 2005. – Vol. 60. – № 2. – P. 174-182.

58. Kang Z. Enhanced production of leech hyaluronidase by optimizing secretion and cultivation in *Pichia pastoris* / Z. Kang, N. Zhang, Y. Zhang // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2016. – Vol. 100. – № 2. – P. 707-717.

59. Kuivanen J. Engineering *Aspergillus niger* for galactaric acid production: elimination of galactaric acid catabolism by using RNA sequencing and CRISPR/Cas9 / J. Kuivanen, Y. M. J. Wang, P. Richard // *Microbial cell factories*. – 2016. – Vol. 15. – № 1.

60. Li J. *piggyBac* Transposon-Based Insertional Mutagenesis for the Fission Yeast *Schizosaccharomyces*

- pombe
- / J. Li, L. L. Du // *Methods in Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 1163. – P. 213-222.
61. Marmur J. [100] A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms / J. Marmur // *Methods in Enzymology*. – 1963. – Vol. 6. – № C. – P. 726-738.
  62. Massahi A. Endogenous signal peptides in recombinant protein production by *Pichia pastoris*: From in-silico analysis to fermentation / A. Massahi, P. Çalık // *Journal of theoretical biology*. – 2016. – Vol. 408. – P. 22-33.
  63. Masselot M. Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Genetical analysis of auxotrophic mutants / M. Masselot, H. de Robichon-Szulmajster // *Molecular & general genetics : MGG*. – 1975. – Vol. 139. – № 2. – P. 121-132.
  64. Metabolic engineering of malolactic wine yeast / J. I. Husnik, H. Volschenk, J. Bauer [et al.] // *Metabolic engineering*. – 2006. – Vol. 8. – № 4. – P. 315-323.
  65. Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors / T. Vogl, L. Sturmberger, P. C. Fauland [et al.] // *Biotechnology and bioengineering*. – 2018. – Vol. 115. – № 4. – P. 1037-1050.
  66. Microbial xylanases and their industrial applications: a review / Q. K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, G. S. Hoondal // *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001 56:3. – 2001. – Vol. 56. – № 3. – P. 326-338.
  67. Mit1 Transcription Factor Mediates Methanol Signaling and Regulates the Alcohol Oxidase 1 (AOX1) Promoter in *Pichia pastoris* / X. Wang, Q. Wang, J. Wang [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2016. – Vol. 291. – № 12. – P. 6245-6261.
  68. Molecular structure of La<sup>3+</sup>-induced methanol dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans* / Y. Hibi, K. Asai, H. Arafuka [et al.] // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2011. – Vol. 111. – № 5. – P. 547-549.
  69. Mori K. The unfolded protein response: the dawn of a new field / K. Mori // *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. – 2015. – Vol. 91. – № 9. – P. 469-480.
  70. Multiplexed CRISPR-mediated engineering of protein secretory pathway genes in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* / W. Kruasuwan, A. Puseenam, S. Tanapongpipat, N. Roongsawang // *PloS one*. – 2021. – Vol. 16. – № 12. – P. e0261754.
  71. Mutation of the homologue of GDP-mannose pyrophosphorylase alters cell wall structure, protein glycosylation and secretion in *Hansenula polymorpha* / M. O. Agaphonov, A. N. Packeiser, M. B. Chechenova [et al.] // *Yeast (Chichester, England)*. – 2001. – Vol. 18. – № 5. – P. 391-402.
  72. Nett J. H. Cloning and disruption of the PpURA5 gene and construction of a set of



- integration vectors for the stable genetic modification of *Pichia pastoris* / J. H. Nett, T. U. Gerngross // *Yeast* (Chichester, England). – 2003. – Vol. 20. – № 15. – P. 1279-1290.
73. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris* / G. P. Lin Cereghino, J. Lin Cereghino, A. Jay Sunga [et al.] // *Gene*. – 2001. – Vol. 263. – № 1-2. – P. 159-169.
74. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product / Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino [et al.] // *Journal of bacteriology*. – 1987. – Vol. 169. – № 12. – P. 5429-5433.
75. Ohsawa S. Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris* / S. Ohsawa, H. Yurimoto, Y. Sakai // *Molecular microbiology*. – 2017. – Vol. 104. – № 2. – P. 349-363.
76. *Pichia pastoris* as a host system for transformations / J. M. Cregg, K. J. Barringer, A. Y. Hessler, K. R. Madden // *Molecular and cellular biology*. – 1985. – Vol. 5. – № 12. – P. 3376-3385.
77. *Pichia pastoris* protease-deficient and auxotrophic strains generated by a novel, user-friendly vector toolbox for gene deletion / M. Ahmad, C. M. Winkler, M. Kolmbauer [et al.] // *Yeast* (Chichester, England). – 2019. – Vol. 36. – № 9. – P. 557-570.
78. PiggyBac transposon-mediated mutagenesis and application in yeast *Komagataella phaffii* / J. Zhu, Q. Zhu, R. Gong [et al.] // *Biotechnology letters*. – 2018. – Vol. 40. – № 9-10. – P. 1365-1376.
79. pMOX: a new powerful promoter for recombinant protein production in yeast *Pichia pastoris* / M. Mombeni, S. Arjmand, S. O. R. Siadat [et al.] // *Enzyme and microbial technology*. – 2020. – Vol. 139.
80. Production of a recombinant peroxidase in different glyco-engineered *Pichia pastoris* strains: a morphological and physiological comparison / A. Pekarsky, L. Veiter, V. Rajamanickam [et al.] // *Microbial cell factories*. – 2018. – Vol. 17. – № 1.
81. Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris* / S. R. Hamilton, W. J. Cook, S. Gomathinayagam [et al.] // *Glycobiology*. – 2013. – Vol. 23. – № 10. – P. 1192-1203.
82. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production / M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2014. – Vol. 98. – № 12. – P. 5301-5317.
83. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* / J. M. Cregg, J. L. Cereghino, J. Shi, D. R. Higgins // *Molecular Biotechnology* 2000 16:1. – 2000. – Vol. 16. – № 1. – P. 23-52.
84. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression / L. S. Qi, M. H. Larson, L. A. Gilbert [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 152. – № 5. –

P. 1173-1183.

85. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools / Y. Cui, J. Xu, M. Cheng [et al.] // *Interdisciplinary sciences, computational life sciences*. – 2018. – Vol. 10. – № 2. – P. 455-465.
86. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // *Bioinformatics* (Oxford, England). – 2014. – Vol. 30. – № 14. – P. 2068-2069.
87. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system / O. W. Ryan, J. M. Skerker, M. J. Maurer [et al.] // *eLife*. – 2014. – Vol. 3. – № August2014. – P. 1-15.
88. SILAC compatible strain of *Pichia pastoris* for expression of isotopically labeled protein standards and quantitative proteomics / R. J. Austin, R. E. Kuestner, D. K. Chang [et al.] // *Journal of proteome research*. – 2011. – Vol. 10. – № 11. – P. 5251-5259.
89. Simple and rapid determination of phytase activity / A. J. Engelen, F. C. van der Heeft, P. H. Randsdorp, E. L. Smit // *Journal of AOAC International*. – 1994. – Vol. 77. – № 3. – P. 760-764.
90. Simplified Gene Knockout by CRISPR-Cas9-Induced Homologous Recombination / N. C. Dalvie, T. Lorgeree, A. M. Biedermann [et al.] // *ACS synthetic biology*. – 2022. – Vol. 11. – № 1. – P. 497-501.
91. Simultaneously down-regulation of multiplex branch pathways using CRISPRi and fermentation optimization for enhancing  $\beta$ -amyrin production in *Saccharomyces cerevisiae* / J. Ni, G. Zhang, L. Qin [et al.] // *Synthetic and systems biotechnology*. – 2019. – Vol. 4. – № 2. – P. 79-85.
92. Soderholm J. Vector for pop-in/pop-out gene replacement in *Pichia pastoris* / J. Soderholm, B. J. Bevis, B. S. Glick // *BioTechniques*. – 2001. – Vol. 31. – № 2. – P. 306-312.
93. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi / A. A. Skomarovsky, A. V. Gusakov, O. N. Okunev [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2005. – Vol. 41. – № 2. – P. 182-184.
94. Superior protein titers in half the fermentation time: Promoter and process engineering for the glucose-regulated GTH1 promoter of *Pichia pastoris* / R. Prielhofer, M. Reichinger, N. Wagner [et al.] // *Biotechnology and bioengineering*. – 2018. – Vol. 115. – № 10. – P. 2479-2488.
95. Synthetic Core Promoters as Universal Parts for Fine-Tuning Expression in Different Yeast Species / R. M. C. Portela, T. Vogl, C. Kniely [et al.] // *ACS Synthetic Biology*. – 2017. – Vol. 6. – № 3. – P. 471-484.
96. Tapscott T. Development of a CRISPR/Cas9 System for *Methylococcus capsulatus* In Vivo Gene Editing / T. Tapscott, M. T. Guarnieri, C. A. Henard // *Applied and environmental microbiology*. – 2019. – Vol. 85. – № 11.

97. The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins / M. Guerfal, S. Ryckaert, P. P. Jacobs [et al.] // *Microbial cell factories*. – 2010. – Vol. 9.
98. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub> / T. Gassler, M. Sauer, B. Gasser [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2020. – Vol. 38. – № 2. – P. 210-216.
99. The *Pichia pastoris* PER6 gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1 / H. R. Waterham, Y. de Vries, K. A. Russel [et al.] // *Molecular and cellular biology*. – 1996. – Vol. 16. – № 5. – P. 2527-2536.
100. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology / R. K. Aziz, D. Bartels, A. Best [et al.] // *BMC genomics*. – 2008. – Vol. 9.
101. The ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath) / N. J. Baxter, R. P. Hirt, L. Bodrossy [et al.] // *Archives of microbiology*. – 2002. – Vol. 177. – № 4. – P. 279-289.
102. Transcriptomic Analysis of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) GS115 During Heterologous Protein Production Using a High-Cell-Density Fed-Batch Cultivation Strategy / C. Zhang, Y. Ma, H. Miao [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2020. – Vol. 11.
103. VATS P. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview / P. VATS // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004.
104. Vogl T. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production / T. Vogl, A. Glieder // *New biotechnology*. – 2013. – Vol. 30. – № 4. – P. 385-404.
105. Wagner J. M. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances / J. M. Wagner, H. S. Alper // *Fungal genetics and biology : FG & B*. – 2016. – Vol. 89. – P. 126-136.
106. Welander P. V. Discovery, taxonomic distribution, and phenotypic characterization of a gene required for 3-methylhopanoid production / P. V. Welander, R. E. Summons // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – № 32. – P. 12905-12910.
107. Xu Z. Comparison and optimization of ten phage encoded serine integrases for genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* / Z. Xu, W. R. A. Brown // *BMC biotechnology*. – 2016. – Vol. 16. – № 1.
108. Yang Z. Genome editing systems across yeast species / Z. Yang, M. Blenner // *Current opinion in biotechnology*. – 2020. – Vol. 66. – P. 255-266.

109. Yu Z. Natural Selection in Synthetic Communities Highlights the Roles of Methylococcaceae and Methylophilaceae and Suggests Differential Roles for Alternative Methanol Dehydrogenases in Methane Consumption / Z. Yu, D. A. C. Beck, L. Chistoserdova // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – № DEC.
110. Гальченко В. Ф. Таксономия и идентификация облигатных метанотрофных бактерий / В. Ф. Гальченко, Л. В. Андреев, Ю. А. Троценко // Пушино: Изд. НЦБИ. – 1986.
111. Гусаков А. В. Белковые ингибиторы микробных ксиланаз / А. В. Гусаков // *Биохимия*. – 2010. – Vol. 75. – № 10. – P. 1331.
112. Каиров В. Пути повышения эффективности комбикормов для сельскохозяйственной птицы / В. Каиров // *Известия Горского государственного аграрного университета*. – 2012. – Vol. 49. – № 3. – P. 119-121.
113. Мерзлов Д. Свойства ферментных препаратов и гомогенных ферментов эндоглюканазы EG2 *Penicillium verruculosum* и эндоглюканазы LAM *Myceliophthora thermophile* / Д. Мерзлов // *Биохимия*. – 2015. – Vol. 20. – № 4. – P. 556-567.
114. Патент РФ 2378372 С2.
115. Сеницын А. Оптимизация состава целлюлазного ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: увеличение гидролитической способности с помощью методов генетической инженерии. / А. Сеницын // *Катализ в промышленности*. – 2015. – Vol. 15. – № 6. – P. 78-83.
116. Сеницын А. Ферментные препараты на основе фитазы / А. Сеницын // *Птицеводство*. – 2005. – Vol. 9. – P. 35.
117. Сеницын А. П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов / А. П. Сеницын, А. В. Гусаков, В. А. Черноглазов // МГУ. – 1995. – P. 144.
118. Сравнительная характеристика ксиланаз XylA и XylE из гриба *Penicillium canescens* / Ю. А. Денисенко, Д. А. Мерзлов, А. В. Гусаков [et al.] // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. – 2015. – Vol. 56. – № 6. – P. 348-353.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ПРИЛОЖЕНИЕ В