



Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук



РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*: КОГДА ЭТО НУЖНО И КАК ДОБИТЬСЯ РЕЗУЛЬТАТА

Рожкова Александра Михайловна
Лаборатория биотехнологии ферментов,
ФИЦ Биотехнологии РАН

РЫНОК ФЕРМЕНТОВ В СОВРЕМЕННОЙ РОССИИ

Объем и динамика рынка ферментов в России в 2014-2023 г.



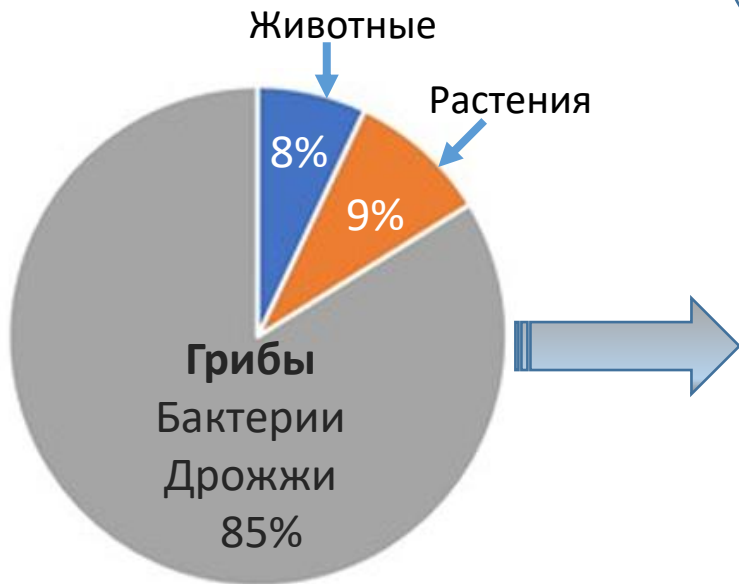
Novozymes	24 %
Genencor	14 %
DSM	13 %
AB Enzymes	6 %
Китай	22 %
Россия	16 %
Другие	5 %

Сиббиофарм (13 %)
(спирт, непищевые протеазы,
кормовые ферменты)
Агрофермент (3 %)
(кормовые ферменты)

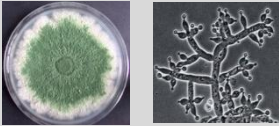
*- по данным Discovery research group, 2023, www.drgroup.ru

МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ – ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БОЛЬШИНСТВА ПРОМЫШЛЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ

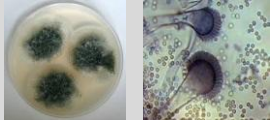
Структура распределения продуцентов для производства ферментов



TRICHODERMA SP
(ALLTECH Ind, KEMIN Ind Inc, DuPont/Genencore, Novozymes, ПО «Сиббиофарм»)




ASPERGILLUS SP
(DSM, BASF, Doler, Китай)



Основные
грибные
платформы

PENICILLIUM SP
(Adisseo, DuPont/Danisco, ООО «Агрофермент»)



ПРЕИМУЩЕСТВА ГРИБНЫХ СИСТЕМ

- ▶ Образование внеклеточных ферментов и ферментных комплексов;
- ▶ Высокая продуктивность штаммов (до 100 г/л секретируемого белка);
- ▶ Процедура выделения конечного продукта проста;
- ▶ Среды культивирования относительно дешевы;
- ▶ Масштабирование процесса технологично;
- ▶ Возможно получение комплексов востребованных ферментов в пределах одного штамма

Penicillium verruculosum – КАК БАЗОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ

P. verruculosum WA 30
(штамм дикого типа)

Нитрозо-
гуанидин

M28-10

Нитрозо-
гуанидин

M40

УФ УФ

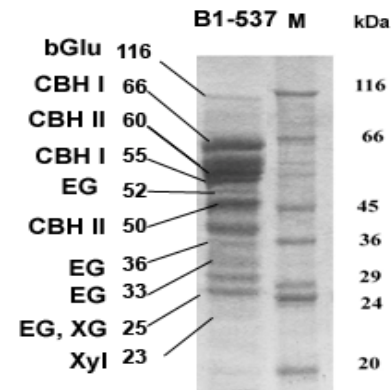
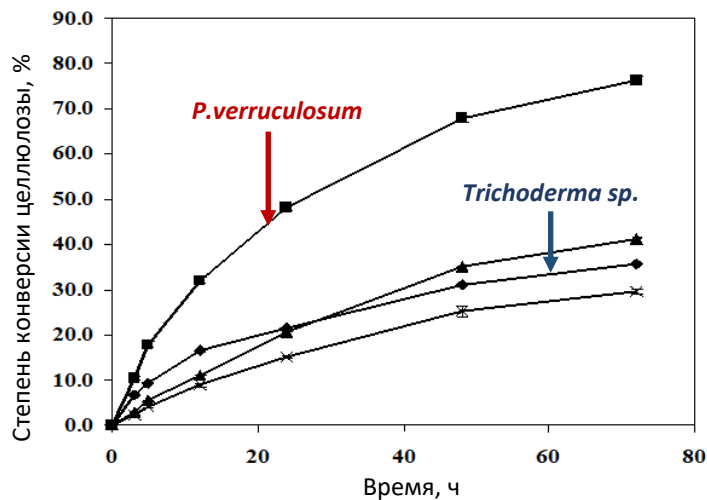
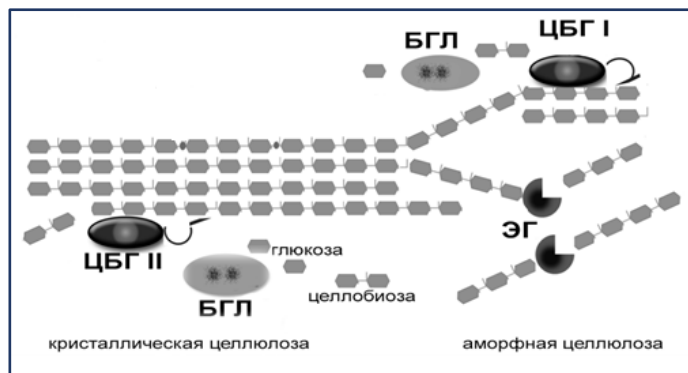
B1-221-6

B1-221-151

НГ

Частичная
дерепрессия штамма
по глюкозе

B1-537 Δ niaD



ЦБГ1 ~ 30-35%
ЦБГ2 ~ 30-35%
ЭГ1/ЭГ2 ~ 10-12%
БГ ~ 4%

Ксиланазы ~ 3-4%

Продуктивность ~ **до 60 г/л**

ЭКСПРЕССИОННАЯ ПЛАТФОРМА *P. verruculosum* 537 (Δ niaD)

Реципиент	Промоторы	Экспрессированные гены
<i>P. verruculosum</i> 537, высокопродуктивный ауксотроф по гену <i>niaD</i> (селекция на NaNO_3)	Индукцибельные: <i>cbh1</i> <i>glaA</i> <i>abfB</i> Конститутивные: <i>hist4.1</i> <i>gpdA</i>	<i>bgl1</i> (целлобиаза) <i>egl1, egl2, egl5</i> (эндо- β -1,4-глюканаза) <i>cbh1, cbh2</i> (целлобиогидролазы) <i>xylA, xylE</i> (ксиланазы) <i>pelA, pglA</i> (пектиназы) <i>inuA, inu1</i> (инулиназы) <i>xgl1</i> (ксилоглюканазы) <i>manB</i> (маннаназы) <i>gox, pto1, tyr</i> (оксидазы) и многое другое

ТРАНСФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА *P. verruculosum*

Общие требования для трансформационных систем:

Для *Penicillium verruculosum* 537:

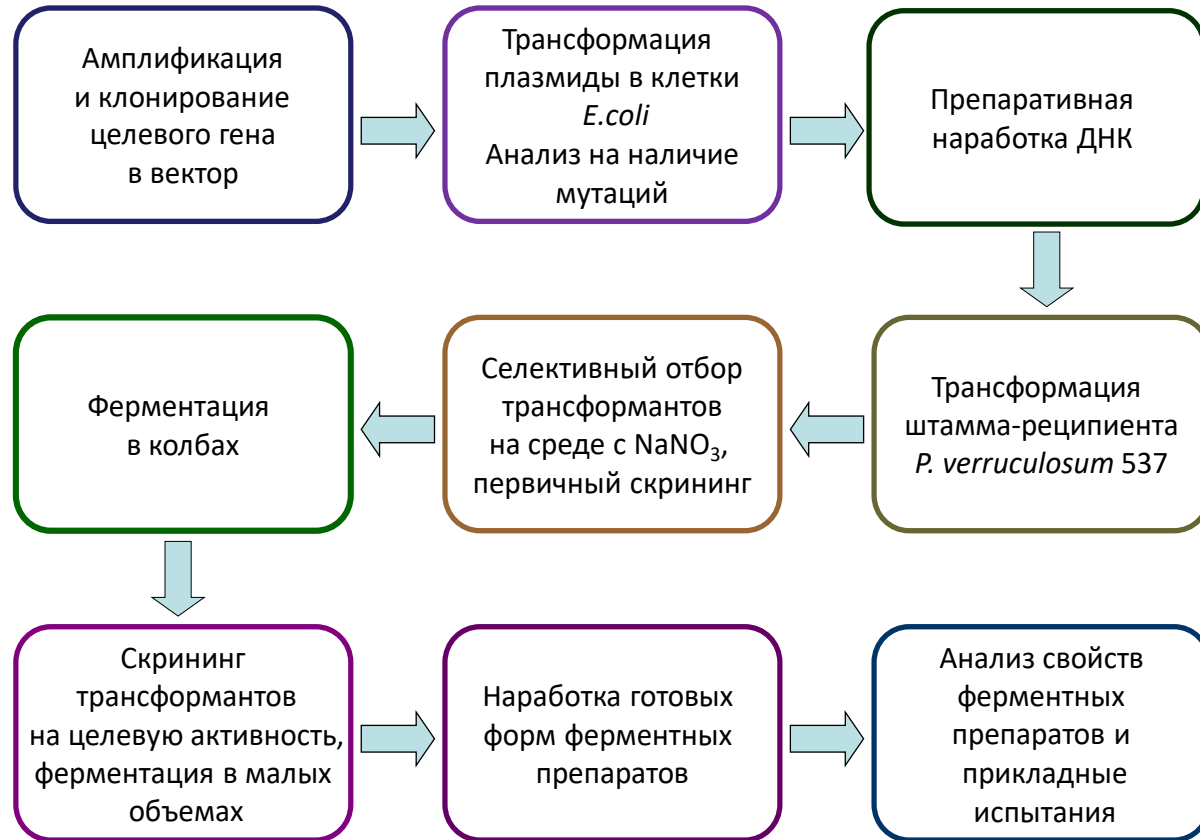
Селективный маркер в штамме	— — →	Δ niaD (дефект в гене нитратредуктазы)
Параметры лизиса	— — →	10 мг/мл лизирующего фермента из <i>T. harzianum</i> , 32°C, 2 ч, 250 об/мин
Форма ДНК	— — →	Линейная или кольцевая
Загрузка ДНК	— — →	3-5 мкг ДНК к $3 \cdot 10^7$ протопластов
Трансформационный протокол	— — →	модифицированный CaCl_2/PEG метод

До трансформации:
(штамм-реципиент,
10 мМ NaNO_3)



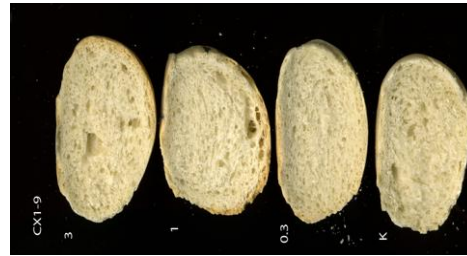
После трансформации:
(рекомбинантный штамм,
10 мМ NaNO_3)

ОБЩАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА

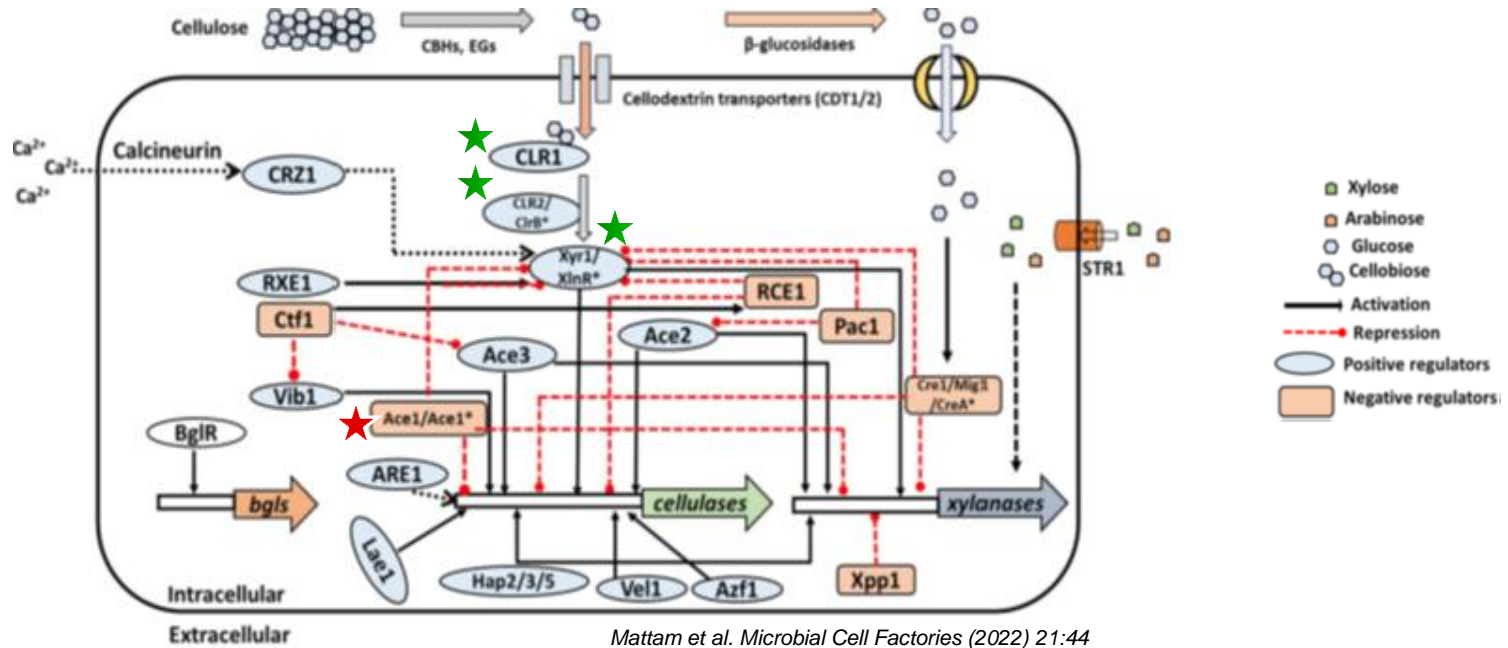


БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *Penicillium verruculosum* (ВКМ-3972D)

- ▶ Ферментные препараты для пищевой промышленности (протеазы, пектинлиазы, оксидазы, инулиназы, ксиланазы и тд)
- ▶ Ферментные препараты для ЦБК (эндоглюканазы, ксиланазы)
- ▶ Ферментные препараты для спиртовой промышленности (целлюлазы- экзо- и эндоглюканазы, бета-глюказидазы)
- ▶ Ферментные препараты для кормопроизводств (комплексные ферментные препараты для гидролиза НПС и фитата)
- ▶ Ферментные препараты для гидролиза возобновляемого растительного сырья (арабиназы, целлюлазы, ксиланазы и тд)



ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЛЮЛАЗ В ГРИБАХ *Penicillium* и *Trichoderma*



СЕКВЕНИРОВАНИЕ
ГЕНОМА



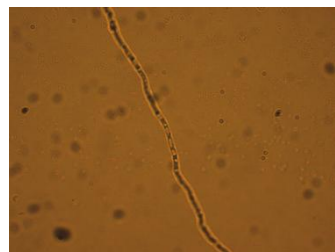
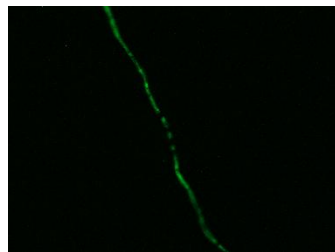
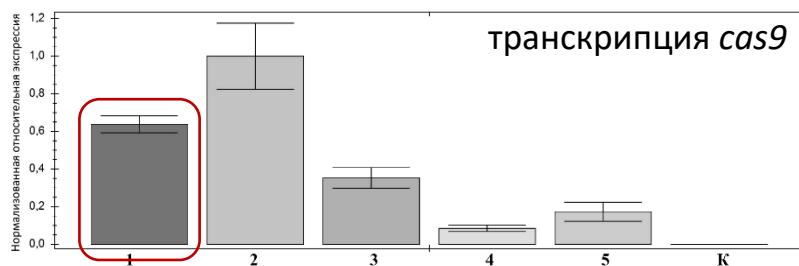
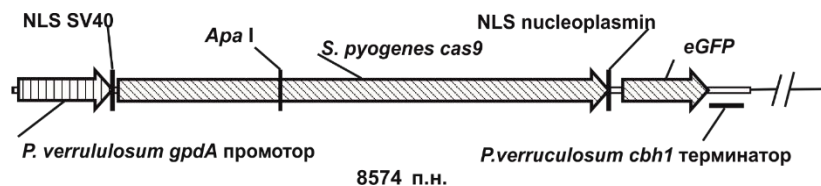
CRISPR-ТЕХНОЛОГИЯ



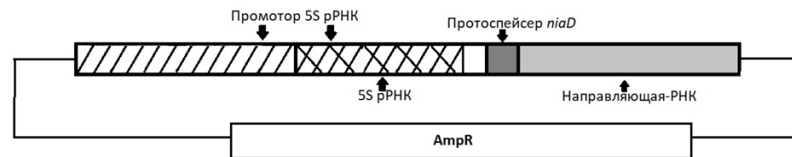
$\Delta XlnR$, $\Delta Clr1$, $\Delta Clr2$, $\Delta Ace1(Tac1)$

CRISPR-CAS9: АДАПТАЦИЯ ДЛЯ *Penicillium verruculosum*

Определение токсичности CAS9:



Проверка работы системы на гене *niaD*:



```

niaD 5'...CCCTCGATGCTGAGTTCCCAGGTTGGGATGTCCTTCATCGGGACTCGTGG
genomic  |||||
DNA      CCCTCGATGCTGAGTTCCCAGGTTGGGATGTCCTTCATCGGGACTCGTGG...5'
                    PAM
                    |||||
5SRNA.....AAAGGACGAAACACCAGGTTGGGATGTCCTTCATCGGG...sgRNA
    
```

Cas9

Исходный ген *niaD*
P. verruculosum 221-151

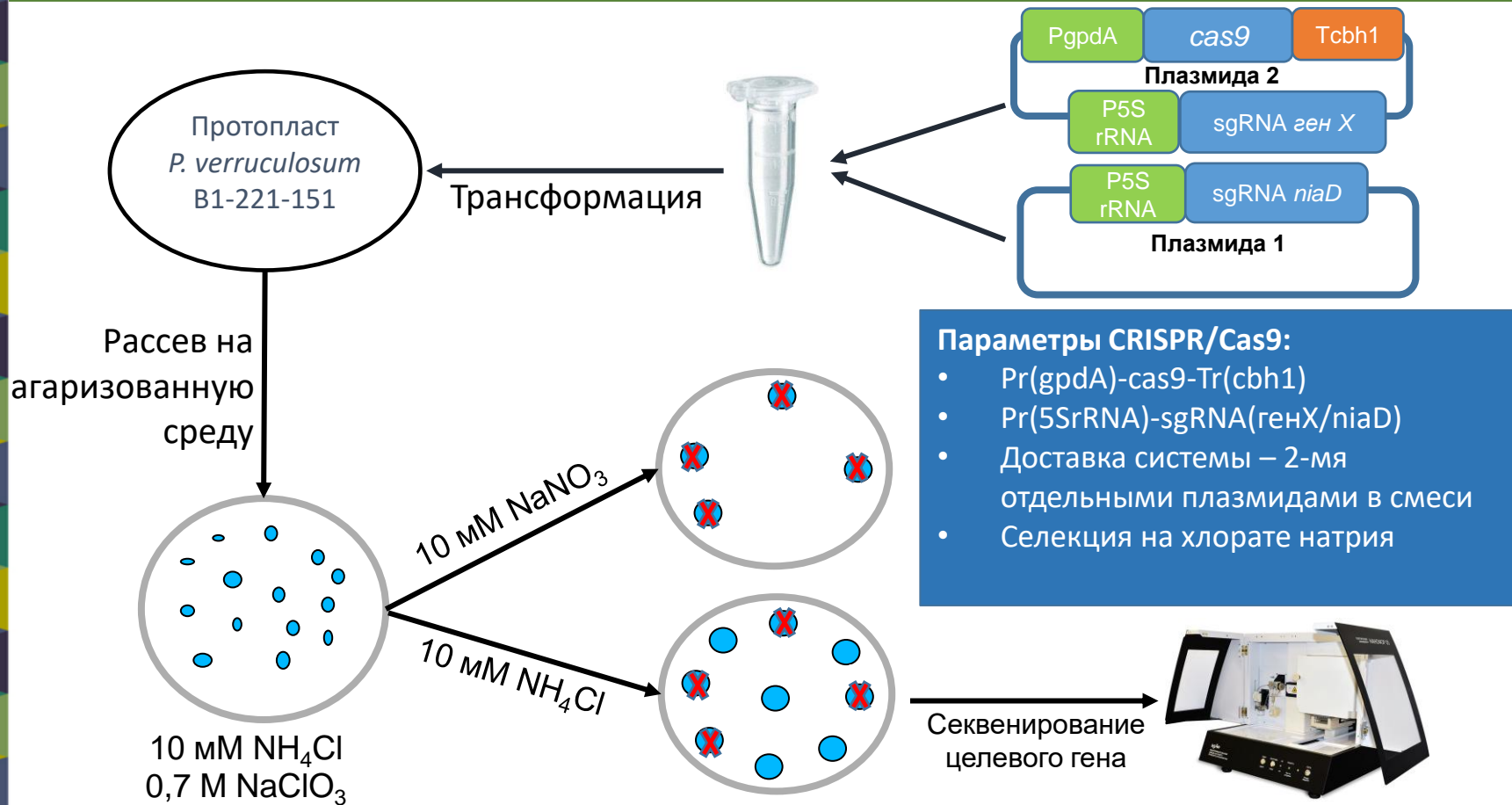
```

AGTCCGCGAT GAAGACATCCCAACCTGGGA
TCAGGCCTA CTCTGTAGGGTTGGACCT
PAM protospacer63
    
```

```

AGTCCGCGAT GAAGACATCCCAACCTGGGA
3 AGTCCGCGA- GAAGACATCCCAACCTGGGA
4 AGTCCGCGAT GAAGACaTCCCAACCTGGGA
8 AGTCCGCGA- GAAGACATCCCAACCTGGGA
2 AGTCCGCGAT GAAGAcATCCCAaCCTGGGA
    
```

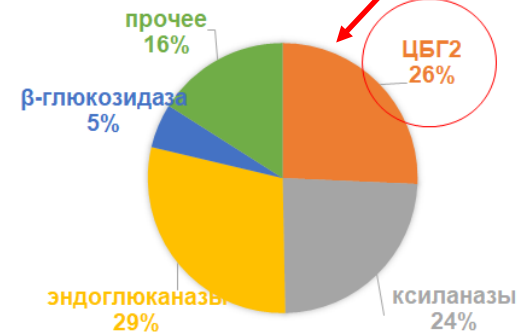
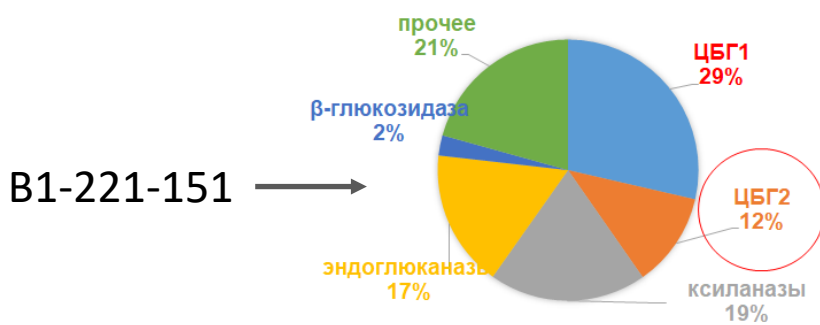
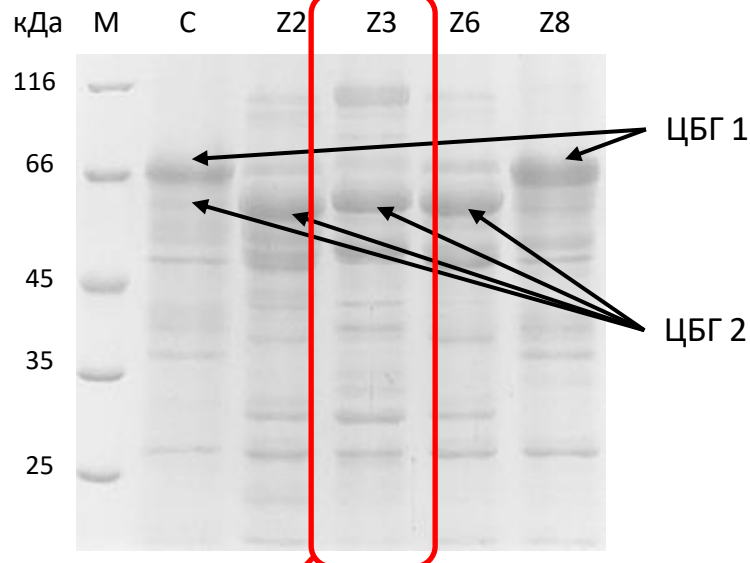
СХЕМА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА CRISPR-CAS9 в *P. verruculosum*



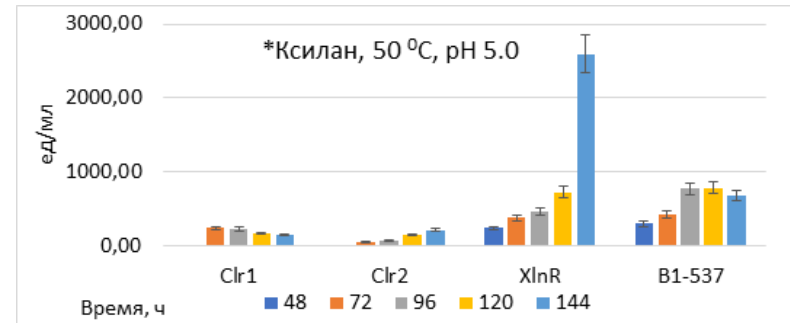
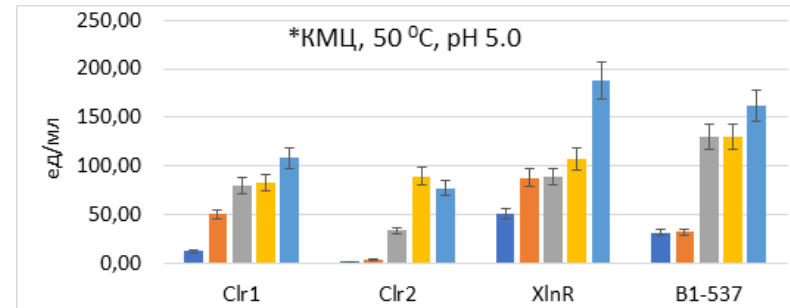
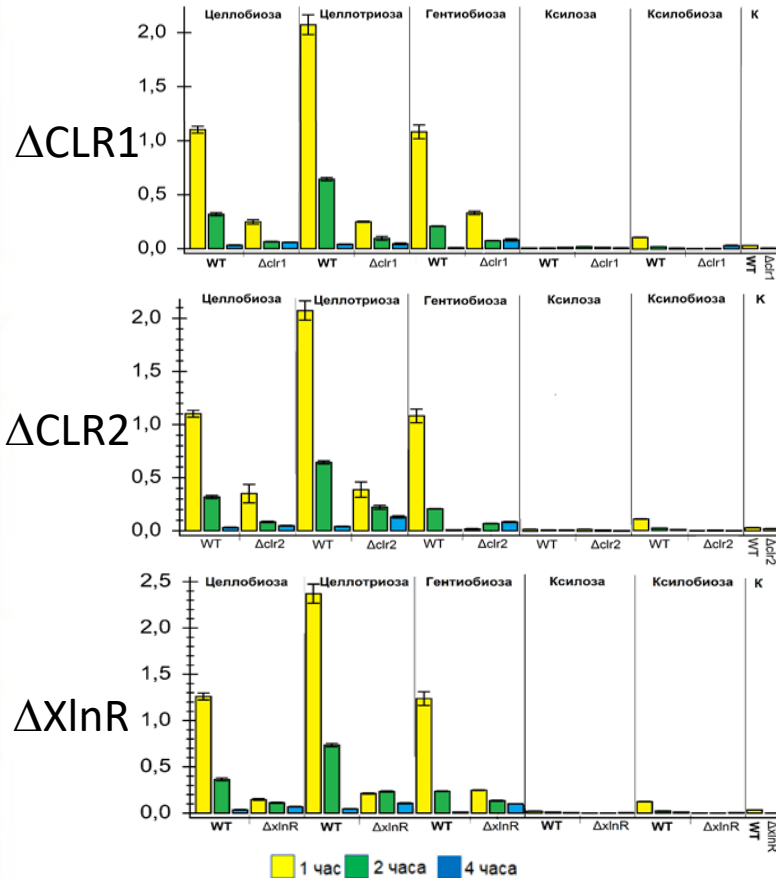
НОКАУТ ГЕНА ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗЫ 1 (CBH1)

niaD wt TGGGCCCGTCCCACGAGTCCCGATGAAGACATCCCAACCTGGGA
 clone Z1 TGG-----ACATCCCAACCTGGGA
 clone Z2 TGGGCCCGTCCCACGAGTCCCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
 clone Z3 TGGGCCCGTCCCACGAGTCCCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
 clone Z4 TGGGCCCGT-----GAAGACATCCCAACCTGGGA
 clone Z5 TGGGCCCGTCCCACGAGTCCCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
 clone Z6 TGGGCCCGTCCCACGAGTCCCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
 clone Z7 TGGGCCCGTCCCACGAGTCCCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA
 clone Z8 TGGGCCCGTCCCACGAGTCCCGA-GAAGACATCCCAACCTGGGA

cbh1 wt TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATCAGGTGGTAGCTGC
 S L S W S T C K S G S C
 clone Z2 TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATAAGGTGGTAGCTGC
 S L S W S T C K *
 clone Z3 TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATGACCTCGTAGCTGC
 S L S W S T C K *
 clone Z6 TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATCCAGGTGGTAGCTGC
 S L S W S T C K S R W *
 clone Z8 TCTTTGAGCTGGTCTACTTGCAAATCC-----TGC
 S L S W S T C K S C



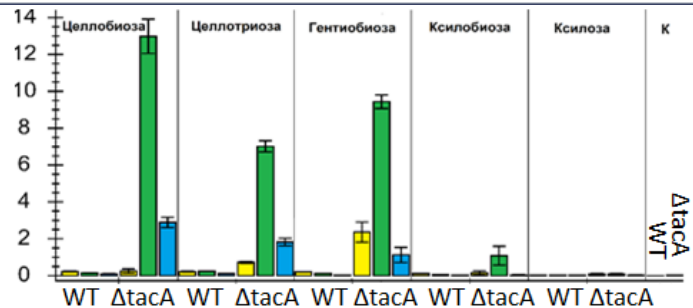
ВЛИЯНИЕ НОКАУТА И СВЕРХЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ Clr1, Clr2 и XlnR НА ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНА *egl2*



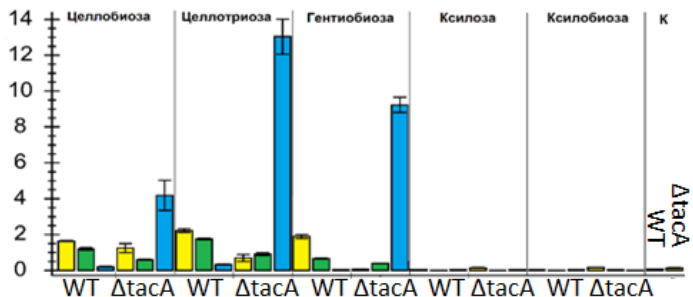
Наиболее заметные эффекты наблюдались для нокаута и сверхэкспрессии транскрипционного фактора XlnR

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *tacA* НА ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНОВ *cbh1*, *bgl1*, *egl2*

а) относительная нормализованная транскрипция гена *cbh1*

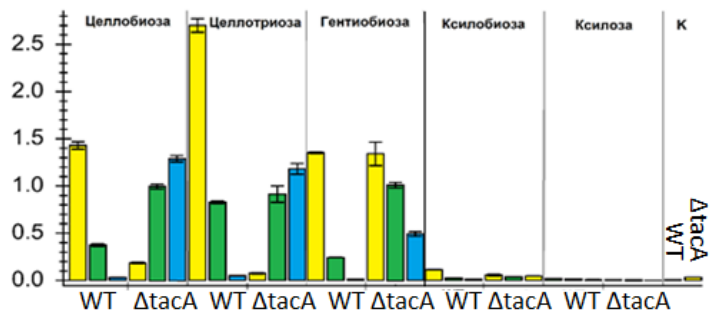


б) относительная нормализованная транскрипция гена *bgl1*



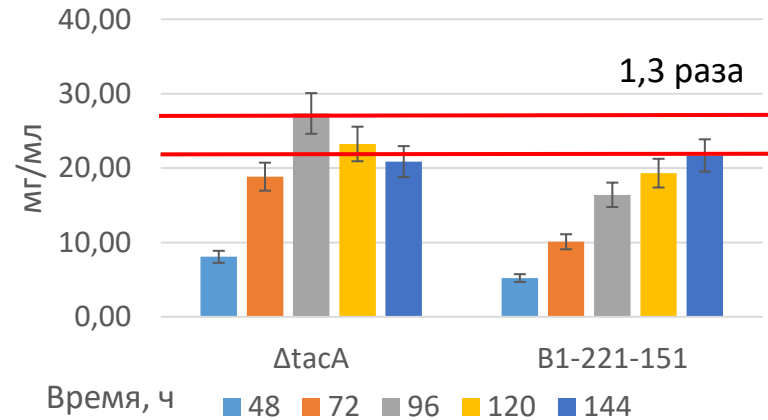
в) относительная нормализованная транскрипция гена *egl2*

■ 1 час ■ 2 часа ■ 4 часа

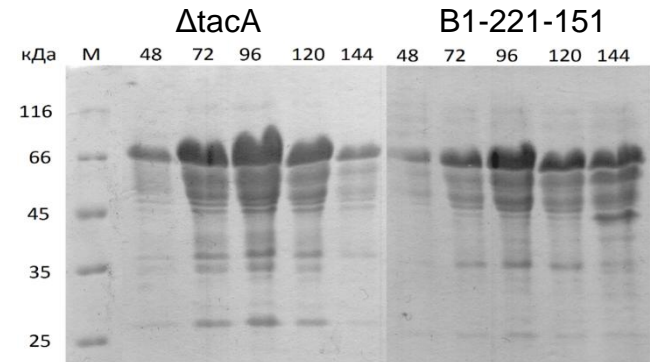


АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НОКАУТА ГЕНА *tacA* НА ПРОДУКТИВНОСТЬ *P. verruculosum* $\Delta TacA \Delta NiaD$

Концентрация белка в КЖ штаммов *P. verruculosum* $\Delta tacA$ и исходного *P. verruculosum* B1-221-151 через 48 – 144 часа



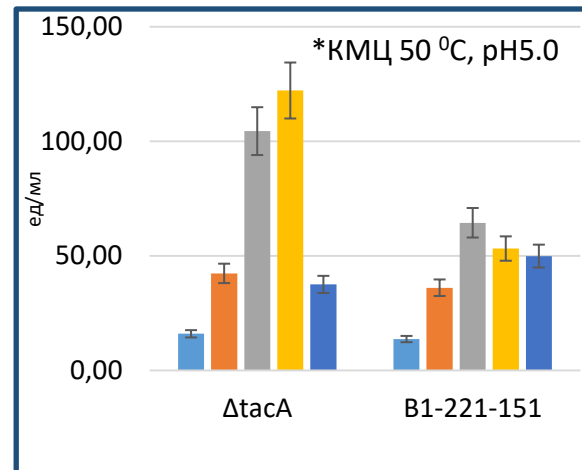
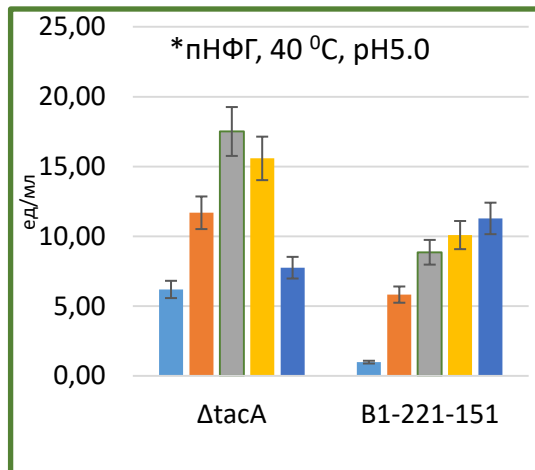
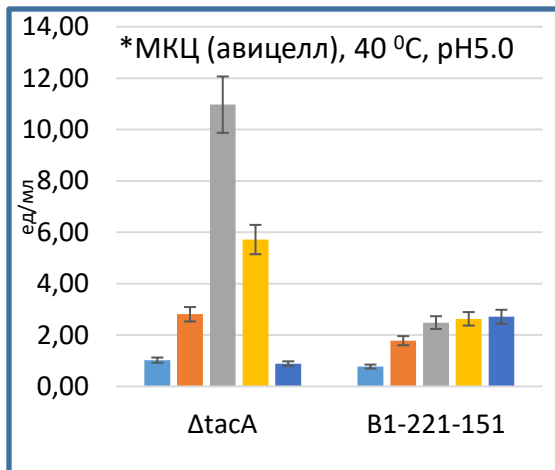
Электрофореграмма КЖ штаммов *P. verruculosum* $\Delta tacA$ и *P. verruculosum* B1-221-151 через 48 – 144 часа



ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *tacA* НА БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЛЮЛАЗ В ШТАММЕ *P. verruculosum* $\Delta TacA \Delta NiaD$

Штамм с нокаутом репрессора *TacA*

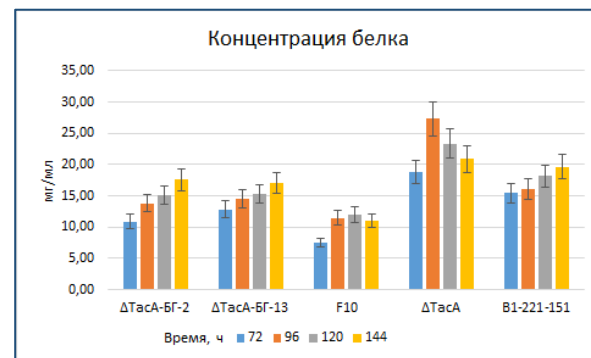
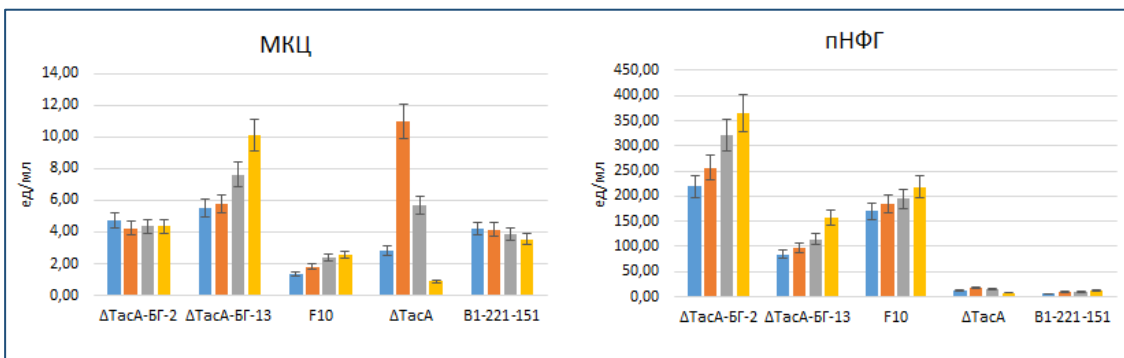
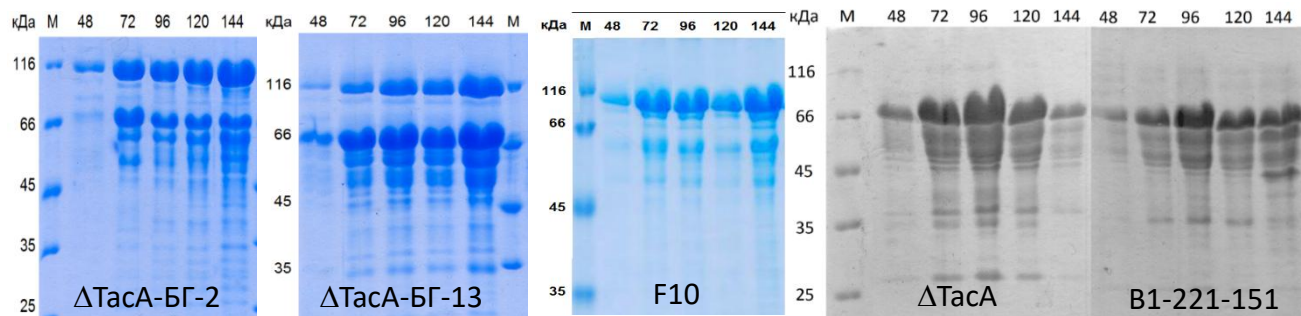
Время, ч 72 96 120 144



На 96 ч культивирования ферментативные активности выросли в 4,4 раза по отношению к микрокристаллической целлюлозе (МКЦ), в 2,0 и 1,6 раза к п-НФ- β -D-глюкопиранозиду (пНФГ) и Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), соответственно

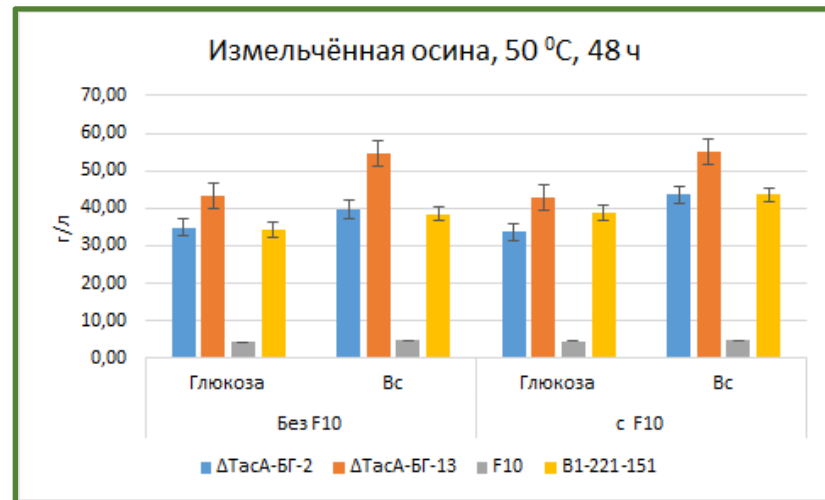
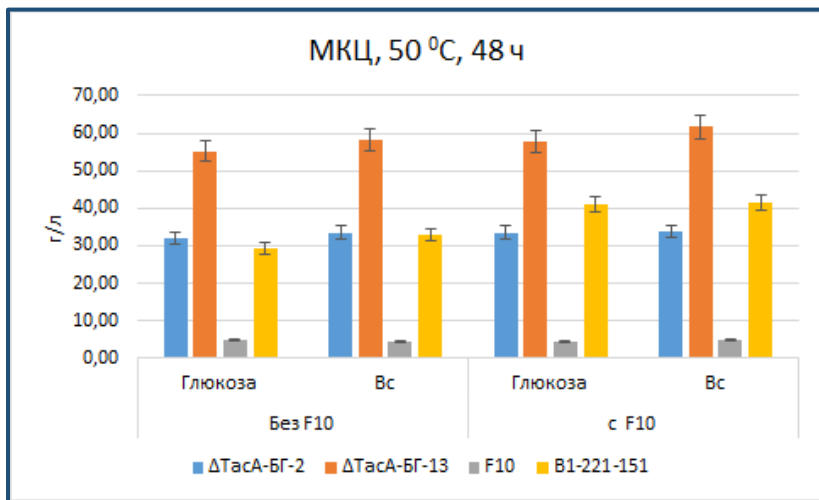
РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА КОМПЛЕКСА ЦЕЛЛЮЛАЗ ДЛЯ ОСАХАРИВАНИЯ ЦЕЛЛЮЛОСОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

В штамме *P. verruculosum* Δ TacA Δ NiaD был экспрессирован ген *bgl1* *A.niger*



Время, ч ■ 72 ■ 96 ■ 120 ■ 144

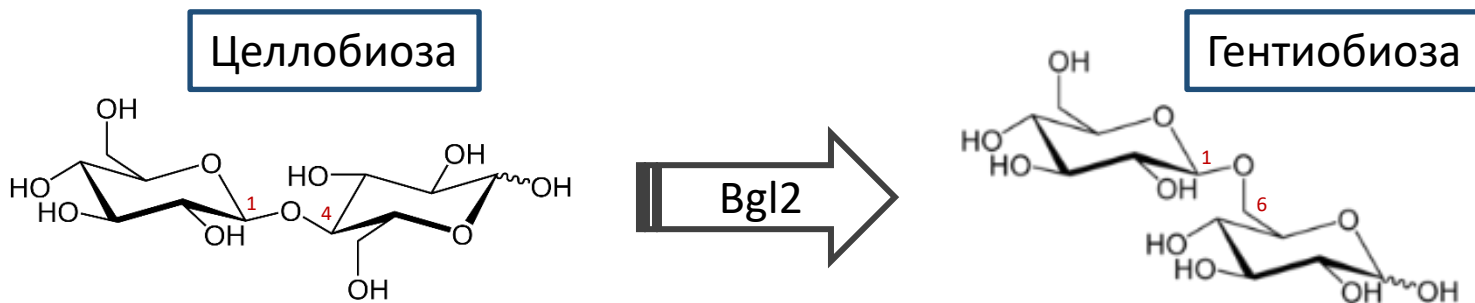
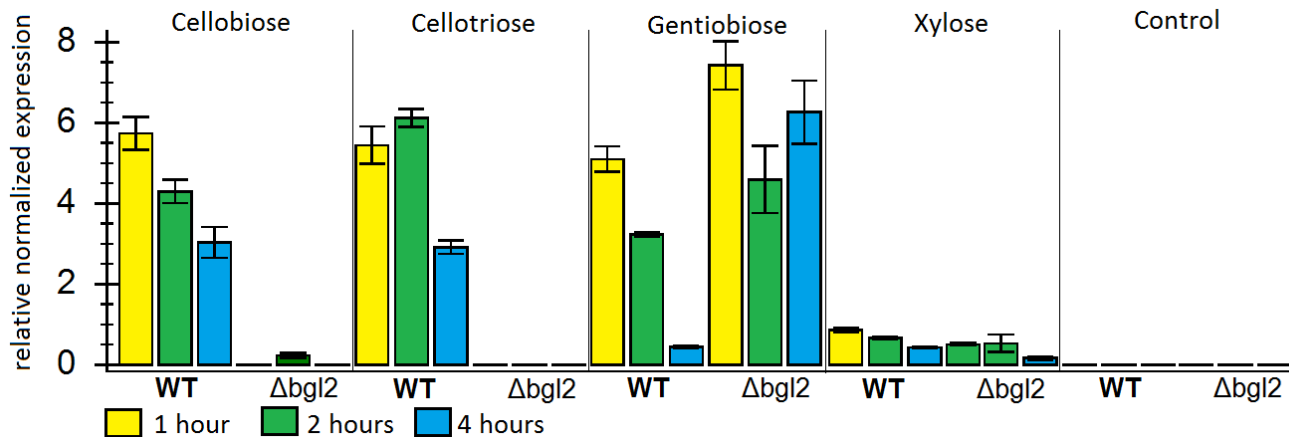
СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИДРОЛИЗА ЦЕЛЛЮЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ



Ферменты	В1-221-151	F10	ΔTас-БГ-13
ΣЦБГ	41	12	44
ΣЭГ	17	2	7
БГЛ+ БГЛ <i>A.niger</i>	2	76	24

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза;
 ЦБГ – целлобиогидролаза
 ЭГ – эндоглюканаза
 БГЛ – бета-глюкозидаза

НОКАУТ ГЕНА *bgl2*, КОДИРУЮЩЕГО ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ БГЛ 2



ТАК ЗАЧЕМ РЕДАКТИРОВАТЬ ГЕНОМ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ?

1. Для решения тактических задач (например, быстрого получения ауксотрофа, нокаута протеаз, нарушение пути биосинтеза токсинов и др.)
2. Для решения перспективных практических задач (корректировка состава ферментативных комплексов, метаболическая инженерия штаммов)
3. Для решение фундаментальных задач биотехнологии (изучение транскрипционно-активаторного механизма, регулировка репрессивного механизма и тд)



**ФИЦ
БИОТЕХНОЛОГИИ**
РАН


Спасибо за внимание!

Рожкова Александра
a.rojkova@fbras.ru

Кислицин Валерий
kislitsin.val@gmail.com

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН
Лаборатория биотехнологии ферментов

 8 495 954-27-32

 info@fbras.ru

 www.fbras.ru