

ОТЧЕТ О РЕАЛИЗАЦИИ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ПРОГРАММЫ (ПРОЕКТА)

предварительный

отчетный период с 01.01.2023 по 31.12.2023

Итоги реализации исследовательской программы за отчетный период

1. Достигнутые результаты исследовательской программы и оценка их востребованности

В 2023г при выполнении исследовательской программы достигнуты следующие результаты:

- В рамках работ по созданию улучшенных штаммов для виноделия на предыдущем этапе методами CRISPR/Cas9 геномного редактирования был получен модифицированный штамм винных дрожжей *S. cerevisiae* I-328, у которого были удалены все 3 копии гена аргиназы CAR1, являющейся важным компонентом пути биосинтеза мочевины, которая при взаимодействии с этанолом может превращаться в канцерогенный этилкарбамат. Микробиологическая характеристика в условиях микровиноделия показала, что вино, полученное с использованием модифицированного штамма, как по химическому составу, так и по органолептической оценке не отличается от полученного с исходным штаммом I-328. Установлено, что использование штамма с удаленным геном CAR1 позволяет снизить содержание мочевины в винном материале, получаемом в условиях микровиноделия на 25%, а этилкарбамата в культуральной среде дрожжей – в 2 раза. Применение полученного штамма с удаленным геном CAR1 в виноделии позволило бы снизить количество образуемой мочевины и, следовательно, канцерогенного этилкарбамата, что повысит безопасность отечественных вин. На созданный штамм получен Патент РФ на изобретение. Применение штаммов с отсутствием аргиназной активности актуально еще и потому, что во многих развитых странах действуют жесткие нормативы на предельно допустимое содержание этилкарбамата в вине, что накладывает ограничения на возможный экспорт данной продукции.

- Проведена молекулярно-генетическая и микробиологическая характеристика полученных на этапе 2022г. методом геномного редактирования штаммов винных дрожжей *S. cerevisiae* I-328, в геном которых вместо гена CAR1 включены гены ферментов яблочно-молочного брожения (ЯМБ), улучшающего вкусовые свойства вина. Установлено, что данная модификация способствовала усилению активности штаммов по сбраживанию яблочной кислоты на 45-60 % по сравнению с контрольным штаммом I-328 и не влияла на другие морфолого-культуральные, физиолого-биохимические и технологические свойства. Транскриптомный анализ подтвердил экспрессию генов ЯМБ и показал, что их вставка влияет на экспрессию генов метаболизма тиамин и некоторых сахаров. Дополнительно были получены штаммы с генами ЯМБ, у которых ген CAR1 дикого типа не нарушен. Таким образом, создана коллекция из 5 штаммов, содержащих кассету ЯМБ. Эта кассета обеспечивает снижение уровня яблочной кислоты, что является важной характеристикой, улучшающей органолептические свойства вина. При этом из пяти ЯМБ штаммов 3 штамма обладают и сниженной аргиназной активностью за счет делеции гена CAR1 пути биосинтеза мочевины. Сочетание ЯМБ-кассеты и делеции гена CAR1 делает такие штаммы особо ценными, поскольку они не только улучшают вкусовые свойства вина, но и делают продукт более безопасным. Подана заявка на получение патента РФ на этот штамм.

- Одним из технологических требований к штаммам-продуцентам рекомбинантных белков является отсутствие протеолитической деградации конечного продукта. Некоторые

секретируемые белки, включая реннин, нестабильны в культуральной среде *Pichia pastoris*, в которой они разрушаются собственными протеазами дрожжей. Для предотвращения протеолиза синтезируемого реннина методами геномного редактирования получен штамм-продуцент реннина, в геноме которого были инактивированы гены аспартилпротеаз япсин 1-1 и япсин 1-4, играющих важную роль в расщеплении гетерологичных белков, продуцируемых дрожжами.

- Получение высокоэффективных штаммов-продуцентов рекомбинантных белков предполагает оптимизацию всех этапов экспрессии, в том числе выбор высокоэффективного индуцируемого промотора, оптимизация кодонного состава экспрессируемого гена и сигнальной последовательности, обеспечивающей секрецию белка в культуральную среду. В 2023 г. был создан штамм-продуцент, в котором ген реннина верблюда был помещен под контроль модифицированного гликолитического промотора PGTN1-1240. Использование этого промотора позволяет сократить время ферментации при увеличении выхода рекомбинантного белка. Нуклеотидная последовательность гена реннина верблюда была синтезирована в оптимальных для *P. pastoris* кодонах, для обеспечения секреции белка в эту последовательность был включен фрагмент сигнального пептида альфа-фактора. Полученный штамм *P. pastoris* ChC1-78 продуцировал реннин на уровне 200 мкг/мл и обладал высокой способностью к сворачиванию молока (4 IMCU/мл).

- Разработана Программа и методики испытаний целевых белков, синтезированных дрожжевыми продуцентами, получены оценки опытных образцов рекомбинантного реннина по всем показателям, заявленным в технических требованиях, включая требования к органолептическим параметрам, физико-химическим показателям, функциональным показателям (ферментативная активность реннина в культуральной жидкости - не менее 40 ед/мл, в конечном растворе препарата - не менее 1 000 ед/мл), потери активности при хранении в течение года - не более 10%, а также к микробиологическим показателям.

- Проанализированы и оптимизированы основные параметры процесса высокоплотного культивирования штамма метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* - продуцента реннина, такие как время внесения и количество добавок сорбитола, время начала, продолжительность и температура в процессе индукции метанолом, концентрация растворенного кислорода. Предложена оптимальная схема культивирования.

- Современные комбикорма для с/х птицы должны содержать ферменты, предназначенные для расщепления некрахмалистых полисахаридов (карбогидразы, ксиланазы) и ферменты, высвобождающие фосфор из фитиновой кислоты, содержащейся в большом количестве в растительном сырье (фитаза). На предыдущих этапах работы был сконструирован штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* PhyEgXyl-7 (ВКМ F-4970D), являющийся продуцентом трех ферментативных активностей, эндоглюканазной, фитазной и ксиланазной, необходимых для деградации некрахмальных полисахаридов зерна, являющегося основой комбикорма для с/х птицы. В 2023г для повышения продуктивности штамма *P. verruculosum* PhyEgXyl-7 с помощью CRISPR/Cas9 геномного редактирования в его геноме был инактивирован ген *tasA*, кодирующий белок-репрессор *TasA*. Новый штамм характеризовался более высокой продукцией внеклеточного белка и обеспечивал повышение всех трех ферментативных активностей до уровней: фитаза – 1200 ед/мл, ксиланаза 1100 ед/мл, эндоглюканаза – 830 ед/мл. Анализ состава ферментного препарата подтвердил наличие в нем фитазы (29% общего белка), ксиланазы (20%), эндоглюканазы (17%) и целлюбогидролаз (29%).

- В 2023г проведены испытания разработанных ферментных препаратов. Для этого были определены зоотехнические и физиолого-биохимические показатели цыплят-бройлеров. Исследования показали, что включение ферментных препаратов в комбикорма с пониженной питательностью позволило обеспечить более высокую продуктивность бройлеров. В частности, при добавке в корм ферментного препарата PhyEgXyl-7 живая масса бройлеров повышалась по сравнению с контрольной группой на 10 % в возрасте 35 суток. В целом, ферментные препараты оказали положительное действие на показатели переваримости и использование основных питательных веществ кормов во всех опытных группах, повышалась перевариваемость корма и конверсия корма.

- Разработан лабораторный технологический регламент получения ферментных препаратов с повышенной гидролитической способностью по отношению к антипитательным факторам кормов на основе штаммов *P. verruculosum* PhyEG-76 (эндоглюканаза и фитаза), PhyXyl-41 (ксиланаза и фитаза) и PhyXylEg-7 (эндоглюканаза, ксиланаза и фитаза). Ферментные препараты получают путем глубинного культивирования штаммов *P. verruculosum* с последующим отделением биомассы, ультраконцентрированием культуральной жидкости и высушиванием на распылительной сушке.

- Индустриальным партнером, ООО «Агрофермент», разработаны технические условия на новый продукт - ферментный препарат АГРОФИТ Е на основе штамма *P. verruculosum* PhyEgXyl-7 (ВКМ F-4970D) - продуцента комплекса ферментов фитазы/ ксиланазы/ эндоглюканазы и технологические инструкции по культивированию штамма-продуцента. Опытные ферментации штамма *P. verruculosum* PhyEgXyl проводились в ферментерах объемами 10 м³ и 40 м³. Отработка технологии и масштабирование производства ферментного препарата АГРОФИТ Е проводились на ферментере объемом 50 л. Активность наработанных сухих ферментных препаратов по фитату натрия составляла 16700 ед/г, по ксилану бука -13970 ед/г, по б-глюкану -12100 ед/г, что удовлетворяет требованиям п 2.2.5 плана-графика.

- При выполнении проекта по созданию продуцентов кормового белка на основе метанотрофных бактерий экспериментально проверена возможность повышения активности ассимиляции углерода метанотрофом *Methylococcus capsulatus* MIR путем внесения в геном дополнительной (третьей) копии генов *hps/phi*, кодирующих ключевые ферменты рибулозомонофосфатного пути - 3-гексулозо-6-фосфатсинтазу и 6-фосфо-3-гексулозоизомеразу – под контролем промотора большой субъединицы метанолдегидрогеназы *Pmxa*. Несмотря на 3-кратное увеличение экспрессии генов *hps/phi* в рекомбинантном штамме по сравнению со штаммом дикого типа, улучшения ростовых характеристик и увеличения содержания белка в клетках достигнуто не было.

- Показана неосуществимость введения дополнительной копии оперона *pRNK* в клетки целевого штамма метанотрофа методом двойной гомологичной рекомбинации.

- Получен модифицированный штамм-продуцент кормового белка из природного газа - *Methylococcus capsulatus* с инактивированными генами *glgA1* и *glgA2*, кодирующими изоформы гликогенсинтазы, что позволяет перенаправить поток углерода от синтеза запасного соединения (гликогена) в основной метаболизм. Культивирование в биореакторе подтвердило, что модифицированный штамм не синтезирует гликоген и не уступает штамму дикого типа по скорости роста и содержанию белка в клетках, однако имеет более короткую лаг-фазу с быстрым переходом к логарифмической фазе роста. Применение модифицированного штамма позволяет сократить производственный цикл

биотехнологических процессов с использованием накопительного и отъемно-доливного режимов.

- Получены штаммы *O. polymorpha* с инактивированным геном ERV29, кодирующем белок, связанный с везикулярным транспортом, и с инактивированным геном MNN2, кодирующим одну из альфа-1,2-маннозилтрансфераз аппарата Гольджи. Оба штамма обладают повышенной эффективностью секреции рекомбинантных белков. Для обеспечения более гомогенного N-гликозилирования продукта получен штамм-продуцент реннина с делецией гена OCH1, кодирующего альфа-1,6-маннозилтрансферазу аппарата Гольджи. Получен штамм *O. polymorpha* в котором одновременно инактивированы гены MNN2 и ERV29. Исследовано влияние мутаций на продукцию реннина в клетках *O. polymorpha*. Увеличение секреции реннина в 1.5 раза наблюдали в штамме с инактивированным геном OCH1, влияние делеций генов ERV29 и MNN2 было существенно менее выраженным.

- Для отработки масштабной продукции секретируемых белков на лабораторном уровне проведены ферментации штаммов-продуцентов реннина *O. polymorpha* CZ9 KPLa 7 и *P. pastoris* ChCl-78.

Таким образом, все запланированные результаты научной программы были достигнуты. Полученные результаты необходимы как для создания продуктов, которые запланированы в рамках программы, так и для расширения компетенций и возможностей в области создания последующих индустриальных биотехнологий с применением геномного редактирования. Актуальность создания отечественных кормовых добавок, ферментных препаратов для пищевой и медицинской промышленности, создание микробиологического источника кормового белка с использованием природного газа в качестве источника углерода, а также создание улучшенных вин - все эти направления, по которым велась и продолжает вестись работа в настоящее время, являются крайне актуальными для развития микробиологической промышленности в Российской Федерации.

2. Создание (развитие) конкурентоспособного на мировом уровне научного коллектива

Коллектив, выполняющий работы, продолжает эффективную работу и имеет в своем составе как опытных руководителей научными проектам, так и научных сотрудников, аспирантов, студентов, преподавателей и инженеров.

3. Подготовка кадров и развитие кадрового потенциала

По всем образовательным программам, разработанным и утвержденным в предыдущем отчетном периоде, в 2023 году прошли обучение 202 человека в вузах-соисполнителях – Воронежском государственном университете инженерных технологий и Московском государственном университете им М.В. Ломоносова. Программы посвящены актуальным областям применения технологий геномного редактирования в индустриальной биотехнологии и пищевой промышленности, включая важнейшие теоретические и практические аспекты применения таких технологий.

Стажировку по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий», проведенную на базе Биологического факультета МГУ им. Ломоносова, прошли 8 молодых ученых.

В отчетном периоде вузом-соисполнителем исследовательской программы было проведено две конференции в области генетических технологий, а именно:

- Школа молодых ученых «Разработка генетических технологий создания штаммов-продуцентов для промышленной биотехнологии» в рамках 13 Международной научной конференции «БИОКАТАЛИЗ. Фундаментальные исследования и применения, г. Суздаль, 27-29 июня 2023 г.
- Научно-практическая конференция с международным участием «Редактирование генома: теория и практика», г. Москва., 21 ноября 2023 г.

4. Создание и развитие на базе научных и образовательных организаций высшего образования лабораторий и центров, осуществляющих исследования в области генетических технологий, в частности технологий генетического редактирования, и их техническая поддержка, по направлениям реализации Федеральной программы

Закуплено и введено в эксплуатацию оборудование для проведения фенотипической селекции генно-модифицированных микроорганизмов для группы геномного редактирования промышленных микроорганизмов. Также закуплен и введен в эксплуатацию комплекс оборудования для получения и анализа белковых продуктов рекомбинантных микроорганизмов для Центра микробной ферментации. Поддержку этих подразделений, включая закупку оборудования для решения новых задач, планируется продолжить в случае продления проекта.