

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

В. Ю. Кислицин¹, А.М. Чулкин², А. М. Рожкова³

¹Институт молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина
Республика Казахстан, 050012, г. Алматы, ул. Досмухамедова, 86.

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Российская Федерация, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
e-mail: kislitsin.val@gmail.com

Мицелиальный гриб *P. verruculosum* является сапрофитным грибом-целлюлолитиком. Ранее с помощью многостадийного неупорядоченного мутагенеза был получен промышленный штамм-производитель целлюлазных препаратов В1-221-151, обладающий продуктивностью до 60 г секретлируемого белка на литр культуральной жидкости. Основными ферментами его секретлируемого комплекса являются целлобиогидролаза 1 и 2 (до 50%), эндоглюканазы (до 12%), β -глюкозидаза (до 4%), и ксиланазы. Также ранее из штамма В1-221-151, был получен рецепиентный штамм В1-537 с дефектом гена нитратредуктазы (*niaD*), что позволяет использовать его для получения препаратов гетерологичных ферментов. Получаемые таким образом ферментные препараты находят применение в сельском хозяйстве, текстильном производстве, биоконвессии растительных отходов и целлюлозо-бумажной промышленности.

Развитие метода геномного редактирования системой CRISPR/Cas дало мощный инструмент для дальнейшего изучения и оптимизации мицелиальных грибов для промышленных задач. Нами также была адаптирована методика геномного редактирования для мицелиального гриба *P. verruculosum*, позволяющая получать штаммы с нокаутами маркерного гена *niaD* и целевых генов. С помощью адаптированной методики нами было изучено влияние транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR, TacA и внутри-

клеточной β -глюкозидазы, Bgl2, на экспрессию целлюлаз в грибе *P. verruculosum*. Наиболее интересный эффект наблюдался при нокауте гена транскрипционного фактора TacA. Его нокаут привёл к увеличению целлобиогидролазной активности более чем в 4 раза, β -глюкозидазной активности в 2 раза, эндоглюканазной в 1,5 раза и ксиланазной более чем в 2 раза по сравнению со штаммом В1-221-151. Также новый штамм *P. verruculosum* может легко использоваться для экспрессии генов гетерологичных ферментов. Например, был получен штамм *P. verruculosum* dT16-13, экспрессирующий помимо собственных целлюлаз β -глюкозидазу *Aspergillus niger*. Гидролитическая активность ферментного препарата получаемого с помощью нового штамма значительно превосходит по гидролитической активности по целлюлозосодержащим материалам ферментный препарат продуцируемый штаммом В1-221-151. При этом выход глюкозы и восстанавливающих сахаров и глюкозы при гидролизе микрокристаллической целлюлозы достигает 60%, а при гидролизе измельчённой осины 40% и 58% соответственно, от изначальной массы субстрата за 48 часов.

Таким образом, адаптация метода геномного редактирования для мицелиального гриба *P. verruculosum* позволило решить как ряд фундаментальных задач, так и создать новый высокоэффективный рецепиентный штамм.