

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Дальневосточный федеральный университет»

ШКОЛА ЭКОНОМИКИ И МЕНЕДЖМЕНТА

Ларионова Алена Александровна

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕННЫХ ПРОТЕИНОВ В
МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБАХ МЕТОДАМИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ
ИНЖЕНЕРИИ**

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
по образовательной программе подготовки магистров
по направлению 38.04.07 «Товароведение», магистерская программа
«Биоэкономика и продовольственная безопасность»

г. Владивосток
2018

Автор работы _____
(подпись)

« _____ » _____ 2018 г.

Консультант (если имеется)

(подпись) (Ф.И.О)

« _____ » _____ 2018 г.

Руководитель ВКР канд.биол.наук, профессор кафедры
Товароведения и экспертизы товаров ШЭМ,
снс ТИБОХ ДВО РАН им. Г.Б. Елякова
(должность, ученое звание)

(подпись) Балабанова Л.А.
(Ф.И.О)

« 03 » июль 2018 г.

Назначен рецензент канд. мед. наук
Исаева Марина Петровна

«Допустить к защите»

Заведующий кафедрой _____
(ученое звание)

(подпись) (Ф.И.О)

« _____ » _____ 2018 г.

Защищена в ГЭК с оценкой _____

Секретарь ГЭК (для ВКР)

(подпись) (Ф.И.О)

« _____ » _____ 2018 г.

ЗАВЕРЯЮ

Е.Б. Гаффорова / _____ /

Подпись

Директор Школы экономики и менеджмента
Директор/ наименование структурного подразделения

« _____ » _____ 2018 г.

В материалах данной выпускной квалификационной работы не содержатся сведения, составляющие государственную тайну, и сведения, подлежащие экспортному контролю.

Е.А. Тюрина / _____ /
Подпись

Заместитель директора по науке и инновациям
Школы экономики и менеджмента
Уполномоченный по экспортному контролю

« _____ » _____ 2018 г.

Оглавление

Введение.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Молекулярное клонирование и методы рекомбинантных ДНК.....	8
1.2 Существующие методы трансформации.....	12
1.2.1 Прямая микроинъекция.....	12
1.2.2 Метод электропорации и генного пистолета.....	13
1.2.3 Метод магнетофекции и фототрансфекции.....	17
1.2.4 Кальций-фосфатный метод.....	19
1.3 Продуценты рекомбинантных белков и гетерологическая экспрессия.....	19
1.3.1. Системы экспрессии рекомбинантных белков и их применение.....	19
1.3.2. Микробиологический синтез белков для обогащения кормов и методы культивирования штаммов-продуцентов.....	22
1.3.3. Поиск ценных протеинов для биотехнологического обогащения кормов.....	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	30
2.1 Поиск оптимального маркера трансформации для термофильных и морских штаммов мицелиальных грибов.....	30
2.2 Получение генетической конструкции на основе растительной плазмиды pSAT.....	33
2.3 Оптимизация условий трансформации мицелиальных грибов.....	35
2.4 Идентификация трансформантов.....	39
2.5 Митотическая устойчивость трансформантов.....	39
2.5.1 Лазерная конфокальная визуализация рекомбинантных белков, слитых с флуоресцентным белком EGFP.....	39
2.6 Получение плазмид с генами рекомбинантных белков.....	40
2.6.1 Способ получения рекомбинантного штамма <i>Th. thermophila</i> / pPZP-RCS2-TEF:Z19-TEF:AhA1-35S:EGFP-TrpC:hph.....	42
2.6.2 Способ получения рекомбинантных белков.....	43
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	44
3.1 Скрининг штаммов мицелиальных грибов на антибиотикорезистентность.....	44
3.2 Получение векторной конструкции и опосредуемая электропорацией трансформация.....	49
3.3 Скрининг эффективности промоторов в мицелиальных грибах.....	52
3.4 Молекулярно-генетический анализ трансформантов.....	55
3.5 Построение экспрессионной конструкции с рекомбинантными белками.....	56
3.6 Построение бинарного вектора для генетической трансформации <i>Th. Thermophila</i>	58
3.7 Характеристика рекомбинантного штамма.....	61
Заключение.....	63
Список используемых источников.....	65
Приложение А.....	74

Введение

Большинство кормов, используемых в сельском хозяйстве, содержат низкий уровень белка и витаминов. Этот дефицит покрывается увеличением производства растительного белка, содержащегося в сельскохозяйственных кормовых культурах, таких как зерно, люцерна, а также рыбной муки и сушеных молочных продуктов. Существует много альтернативных источников растительного белка для рациона скота. К ним относятся масличные культуры, побочные продукты производства продуктов питания, кормовые и бобовые культуры. Многие из доступных традиционных рационов основаны на использовании агропромышленных побочных продуктов, таких как хлопковый торт или кукурузный глютен, полученный из зерен *Zea mays* [48]. Кукурузный глютен имеет содержание белка около 20-60% и волокон до 10% [18]. Однако, небольшое количество лизина и много лейцина делают аминокислотный состав белков кукурузы (зеинов) еще более несбалансированным. Растительные белки семян амаранта, большинство из которых являются глобулинами, напротив, имеют самый высокий уровень содержания незаменимых аминокислот [54]. Семена амаранта содержат в среднем от 15% до 18% белка, от 5% до 8% масел и от 3,7% до 5,7% волокон, что превышает содержание этих веществ у большинства злаков [29, 66]. Кроме того, у амаранта безглютеновые семена, что является привлекательной пищевой и кормовой альтернативой против целиакии и чувствительности к глютену.

Однако стоимость сбалансированных кормов очень высока, а производство животноводческой продукции становится неэкономичным из-за высокой цены на кормовые ингредиенты [48].

Таким образом, проблема удовлетворения мирового спроса на белок в продуктах питания и кормах остается актуальной. Спрос на растительный белок выше, чем общий объем производства белка с общемировых пахотных земель, которые в настоящее время могут производить 600 миллионов тонн белка (из листьев и семян) [57, 61].

Белки, продуцируемые в микробных клетках бактерий, грибов или водорослей, могут быть использованы для улучшения содержания белка в кормах для животных. Микроорганизмы как биологические объекты послужили основой для разработки и организации крупнотоннажных биотехнологических производств ценных продуктов, в том числе и лекарственных средств. Это обусловлено их значительным генетическим разнообразием, простотой организации, быстрым ростом, а также способностью развиваться на простых, доступных и экономичных питательных средах, в том числе и на отходах различного происхождения, например, на бытовых, сельскохозяйственных, производственных [12]. Использование микробных продуцентов позволяет в течение непродолжительного времени осуществить биологический синтез больших количеств целевого продукта в строго контролируемых условиях производства.

Было показано, что из различных методов, доступных производителям, добавление дефицитных питательных веществ в виде биомассы после ферментативной обработки лигноцеллюлозолитических грибов в сочетании с химическим и физическим воздействием является эффективным для использования низкокачественных кормов, таких как остатки соломы и других агропромышленных отходов [39]. Грибы содержат от 30% до 50% белка с повышенным содержанием треонина и лизина в соответствии с рекомендациями Продовольственной и сельскохозяйственной организации (ФАО) [32]. Они производят витамины (тиамин, рибофлавин, биотин, ниацин, пантотеновая кислота, пиридоксин, холин, стрептогенин, глутатион, фолиевая кислота и п-аминобензойная кислота), а также клетчатку (глюканы клеточной стенки). Кроме того, мицелиальные грибы имеют умеренное содержание нуклеиновой кислоты (от 7% до 10%) по сравнению с бактериальными и дрожжевыми клетками. Продукты коммерчески доступных мицелиальных грибов *Paecilomyces varioti* и *Fusarium venenatum*, полученные с использованием лигноцеллюлозных сахаров, являются хорошим источником важных витаминов группы В и перевариваемого микробного белка для потребления животными и человеком соответственно [32]. Было обнаружено, что термофильный микромицет *Thermothelomyces thermophila* (ранее

Myceliophthora thermophila) является перспективным источником новых ферментов для промышленного применения, включая термостабильные ферменты для деградации биомассы. Было показано, что *Th. thermophila* может также служить клеточной фабрикой для производства химических веществ и биотоплива из возобновляемого лигноцеллюлозного сырья [46, 55].

Кроме того, возможность конструирования организмов с заданными свойствами существенно видоизменила структуру и содержание современного биотехнологического производства: значительно повысилась продуктивность производственных штаммов микроорганизмов - продуцентов целевых продуктов за счет усовершенствования метаболического пути их биосинтеза. Разработка генетических конструкций рекомбинантных белков при помощи инструментов молекулярной биологии и метаболической инженерии, позволит создать генно-инженерные штаммы мицелиальных грибов с заданными свойствами. Это послужит в дальнейшем основой для разработки и организации крупнотоннажных биотехнологических производств сбалансированного кормового белка.

В настоящем исследовании был впервые разработан плазмидный вектор для трансформации и направленного синтеза рекомбинантных белков в мицелиальных грибах. С помощью новой высокоэффективной системы трансформации мицелиальных грибов был модифицирован термофильный микромицет *Th. thermophila* F-859, и показана возможность получения в его клетках кормовых белков из семян *Zea mays* и *Amaranthus hypochondriacus* L. с использованием сельскохозяйственных растительных остатков в качестве питательного субстрата.

Цель данной работы заключается в разработке технологии получения рекомбинантных белков в мицелиальных грибах методами метаболической инженерии.

Задачами выпускной квалификационной работы являются:

- 1 Поиск оптимального маркера трансформации для термофильных и морских штаммов мицелиальных грибов.
- 2 Получение генетической конструкции на основе растительной плазмиды pSAT.

- 3 Оптимизация промоторов для синтеза рекомбинантных белков.
- 4 Оптимизация условий трансформации мицелиальных грибов.
- 5 Получение бинарного вектора для синтеза кормовых белков и целлюлозолитических ферментов.

Под объектом исследования понимаются мицелиальные грибы и методы их трансформации.

Предметом исследования в данной выпускной квалификационной работе является получение генетической конструкции на основе растительной плазмиды pSAT, поиск оптимального маркера трансформации и промоторов для штаммов мицелиальных грибов, использование методов метаболической инженерии, а под методами исследования понимаются методы микробиологии и молекулярной биотехнологии, статьи, журналы, электронные ресурсы, учебники и учебные пособия.

Выпускная квалификационная работа выполнена на 76 страницах, состоит из введения, трех глав и заключения, содержит 16 рисунков, 6 таблиц. Список использованных источников - 90, приложение - 1.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Молекулярное клонирование и методы рекомбинантных ДНК

В клетку можно встроить практически любой ген, который можно получить из ДНК любого организма. Для этого используют векторы. Самая главная цель вектора – это донести требуемую ДНК в клетку-реципиент. Уже затем встроить ее в геном, провести идентификацию трансформированных клеток и обеспечить стабильную экспрессию введенного гена [4, 86]. Вектор - это кольцевая молекула ДНК или РНК небольшого размера, состоящая из двух компонентов:

- векторной части, другими словами «носителя»;
- клонируемого чужеродного гена.

Векторная молекула должна обладать несколькими обязательными свойствами:

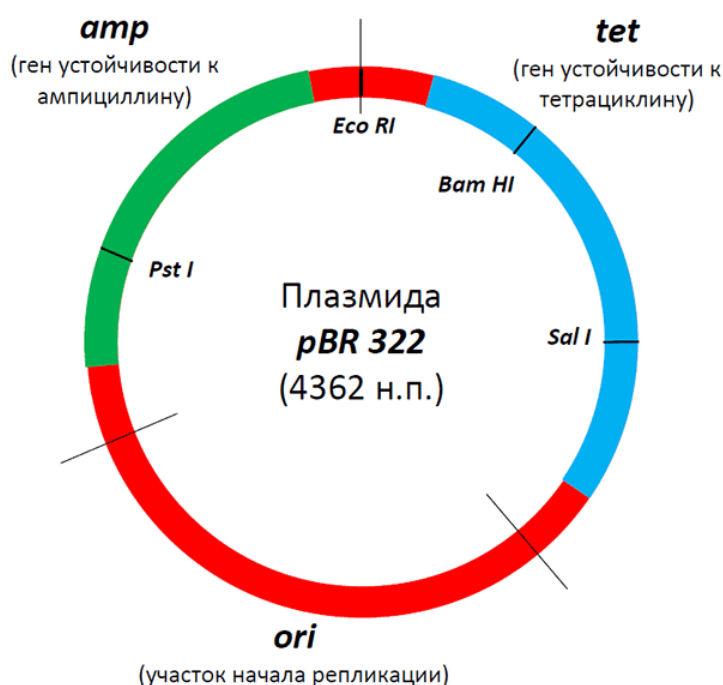
- любой вектор должен реплицироваться автономно или вместе с хромосомами клеток;
- в любом векторе должны быть биохимические или генетические маркеры, которые позволяли бы обнаруживать его присутствие в клетках и выращивать в дальнейшем трансформированные клетки на селективной среде, что указывало бы на успешность трансформации;
- структура векторной молекулы должна допускать встраивание в нее чужеродной последовательности нуклеотидов без нарушения ее функциональной целостности [4].

В генной инженерии в качестве клонирующих векторов используются плазмиды, вирусы и искусственные хромосомы.

Самыми первыми векторами стали бактериальные плазмиды. Основная масса клеточной ДНК бактерий содержится в хромосоме. Однако, кроме хромосом, бактерии содержат большое количество очень маленьких кольцевых молекул ДНК - плазмид, длиной несколько тысяч пар оснований. Такие мини-хромосомы называют плазмидами. Они представляют собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, имеющие клонирующий лимит до ~10 тысяч пар нуклеотидов

(тнп). Многие плазмиды кодируют важные функции, например такие как: устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам, способность усваивать определенные вещества. В одной клетке могут сосуществовать только плазмиды, принадлежащие к разным группам совместимости. Каждая плаزمида содержит сайт инициации репликации, специфичность которого определяет круг хозяев плазмиды, некоторые могут реплицироваться только в клетках одного вида, другие имеют широкий спектр хозяев. Поскольку эти гены находятся в плазмиде, они представлены большим числом копий. Высокая копийность плазмид обеспечивает клетке синтез большого количества ферментов, химически нейтрализующих антибиотики или ксенобиотики, что и обеспечивает устойчивость к последним. Уже сконструировано огромное количество различных векторов на основе плазмид, так как единственным обязательным элементом плазмиды является небольшой сайт инициации репликации, а с остальной последовательностью можно проводить любые действия [75, 76].

Схема плазмидного вектора рассмотрена подробно на рисунке 1.



Источник: [75]

Рисунок 1 – Структура плазмидного вектора PBR322

Как видно по рисунку 1, в плазмиде PBR322 есть участок начала репликации – «ori», благодаря которому она может размножаться в клетках бактерии *Esherichia coli*. Далее, представлены гены устойчивости к двум антибиотикам - ампициллину «amp» и тетрациклину «tet», а также множество сайтов рестрикции, но на рисунке 1 представлены только четыре - «Eco RI», «Sal I», «Pst I», «Bam HI». Промоторные участки не показаны на структуре плазмидного вектора, однако они присутствуют в векторах. Некоторые сайты рестрикции находятся в генах устойчивости к ампициллину или тетрациклину, в результате чего и тот и другой сайт можно использовать в качестве второго селективного маркера [34, 75]. Допустим, если разрезать ген устойчивости к ампициллину с помощью рестриктазы «Pst I» и вшить в это место вставку, то тетрациклин будет первым селективным маркером, а ампициллин - вторым, тогда селекция будет выглядеть следующим образом:

- 1) трансформируем бактерии,
- 2) выращиваем их на среде с тетрациклином,
- 3) выбираем только хорошо растущие клоны,
- 4) переносим эти клоны на среду с ампициллином и выбираем те, рост которых угнетается.

Если же вшить вставку внутрь гена устойчивости к тетрациклину, предварительно разрезав его с помощью рестриктаз «Bam HI» или «Sal I», тогда необходимо будет сначала посадить их на среду с ампициллином, а потом с тетрациклином [75, 76].

Векторы должны иметь полилинкер - область, чувствительную к определенным рестрикционным эндонуклеазам. Они расщепляют вектор только в одном участке, превращая его из кольцевой формы в линейную. Уже к линейной форме вектора можно с помощью ферментов - лигаз, присоединять ген [86].

Генетические маркеры, входящие в состав вектора, подразделяются на две группы, дающие возможность отличить трансформированные клетки:

- 1) селективный ген,
- 2) репортерный ген.

Селективные гены отвечают за устойчивость к антибиотикам. В процессе «работы» данного маркера, трансформированные клетки способны расти на селективной питательной среде с добавлением определенных веществ, которые могут ингибировать рост и деление нетрансформированных клеток.

Репортерные гены способны кодировать для клеток нейтральные белки, определить наличие которых можно протестировав. В качестве таких генов используют гены белков:

- «GFP» (green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок;
- «GUS» β -глюкуронидазы.

Наибольшее распространение получил ген зеленого флуоресцентного белка, так как способен флуоресцировать в видимой области спектра, точнее в зеленой, при облучении длинноволновым УФ. Данная способность к флуоресценции обусловлена белком, и благодаря этому свойству, ген белка «GFP» является перспективным маркером, позволяющим проводить различные исследования с трансгенными организмами и клетками [4].

Последовательности ДНК, расположенные перед началом структурного гена и определяющие степень активности РНК-полимеразы, называются регуляторными последовательностями. Одна из таких последовательностей представляет собой участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза. Этот участок называется промотором [71].

Для растений часто используют промоторы от растительных вирусов, которые эволюционно приспособлены к функционированию в растительной клетке. Промоторы могут быть действующими во всех тканях в течение всей жизни растения. К наиболее сильным и широко используемым конститутивным промоторам, функционирующим в растениях, относятся:

- 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (p35s CaMV), созданный на базе промоторной области гена белка оболочки вируса мозаики цветной капусты;
- промотор гена нопалинсинтазы из *Agrobacterium tumefaciens* (nos).

1.2 Существующие методы трансформации

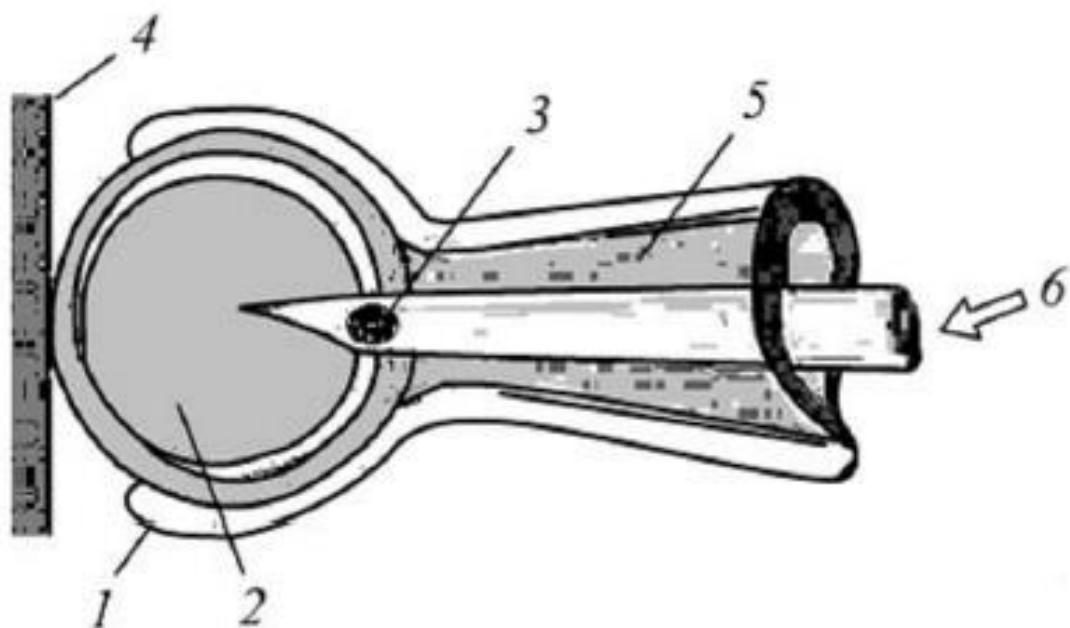
В настоящее время генная инженерия широко применяется в экспериментальной биологии, в частности для трансфекции и трансдукции эукариотических клеток, или организмов, а также для трансформации прокариотических клеток [30, 70, 71]. Трансформация представляет собой наиболее универсальный путь передачи генетической информации, поэтому она имеет наибольшее значение для генетической инженерии.

Трансформация - это перенос свободной ДНК, в том числе и плазмидной, в реципиентную клетку, вызывающий изменение признаков клетки. При этом происходят рекомбинация и интегрирование однонитевого фрагмента ДНК в хромосому реципиента или какую-либо внехромосомную генетическую единицу. Проще говоря, путем трансформации происходит передача генов, встроенных в плазмиду. Все методы для трансфекции, представленные ниже, подходят и для трансформации прокариотических клеток [13].

1.2.1 Прямая микроинъекция

Данный метод осуществляется с применением микроиглы. ДНК трансфицируется с помощью микроиглы с диаметром кончика порядка от 400 до 900 нм. Гены доставляются непосредственно в ядро, что значительно повышает вероятность встраивания плазмиды в геном клетки и, следовательно, способствует более стабильной экспрессии трансфицированного белка.

Метод прямой микроинъекции можно увидеть на рисунке 2, который представлен ниже.



Источник: [30]

Рисунок 2 – Схема пересадки ядер:

1 - капсула-держатель, 2 - бластомер, 3-ядро для пересадки,
4 - стекло для упора, 5-изотонический раствор, 6 - подача давления для
пересадки ядра

Данный метод применим лишь к малым молекулам ДНК, которые не будут повреждаться при прохождении через микрокапилляр. Так же, для осуществления прямой микроинъекции, клетки должны обладать большим ядром. Но у данного метода существуют и недостатки:

- метод микроинъекции является очень трудоемкий, поэтому не подходит для исследований, которые требуют большого количества клеток для трансфекции;
- аппарат для исследования является дорогостоящим [30].

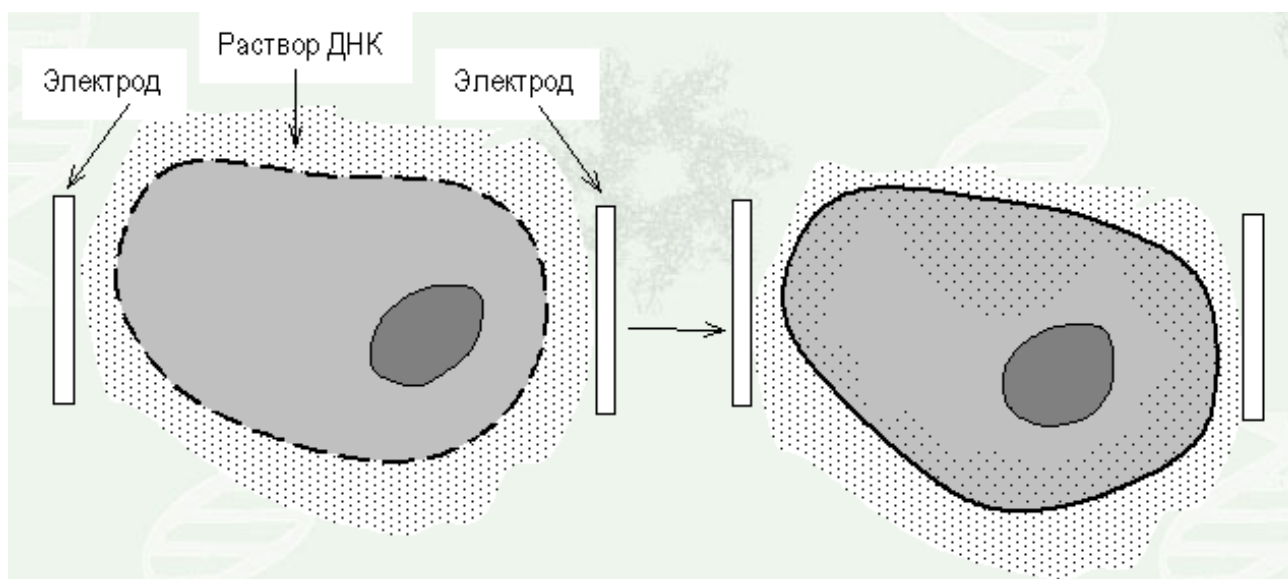
1.2.2 Метод электропорации и генного пистолета

Электропорация - наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки [70]. Явление электропорации основано на том, что мембраны обладают способностью концентрировать электрическое поле.

Различают несколько видов электропорации:

- 1) электропорацию клеточных суспензий,
- 2) электропорацию единичных клеток,
- 3) электропорацию *in vivo*.

При помещении суспензии клеток в электрическое поле с напряженностью от нескольких сотен до нескольких тысяч вольт на квадратный сантиметр площади и продолжительностью воздействия в течение промежутка времени от десятков микросекунд до десятков миллисекунд, удается индуцировать резкое возрастание проводимости клеточных мембран. Таким образом, пребывание клеток в электрическом поле способствует образованию в ней проводящих пор, через которые возможна диффузия различных гидрофильных веществ, в том числе ДНК и РНК, при этом объем клетки увеличивается [8, 30, 70]. Наглядно это можно увидеть на рисунке 3.



Источник: [70]

Рисунок 3 – Метод трансформации путем электропорации

Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и реципиентных клеток для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками [7, 70].

Электропорация единичных клеток и электропорация *in vivo* осуществляется с помощью электрода, подведенного к клетке или к области, в случае *in vivo*, где необходимо выполнить трансфекцию [62]. При подаче импульса внутри электрода, содержащего раствор ДНК (РНК), создается небольшое давление, что приводит к попаданию нуклеиновой кислоты в клетку. Метод трудоемкий, так как необходимо проводить манипуляции с каждой клеткой отдельно [30].

Преимущества и недостатки методов электропорации представлены в таблице 1.

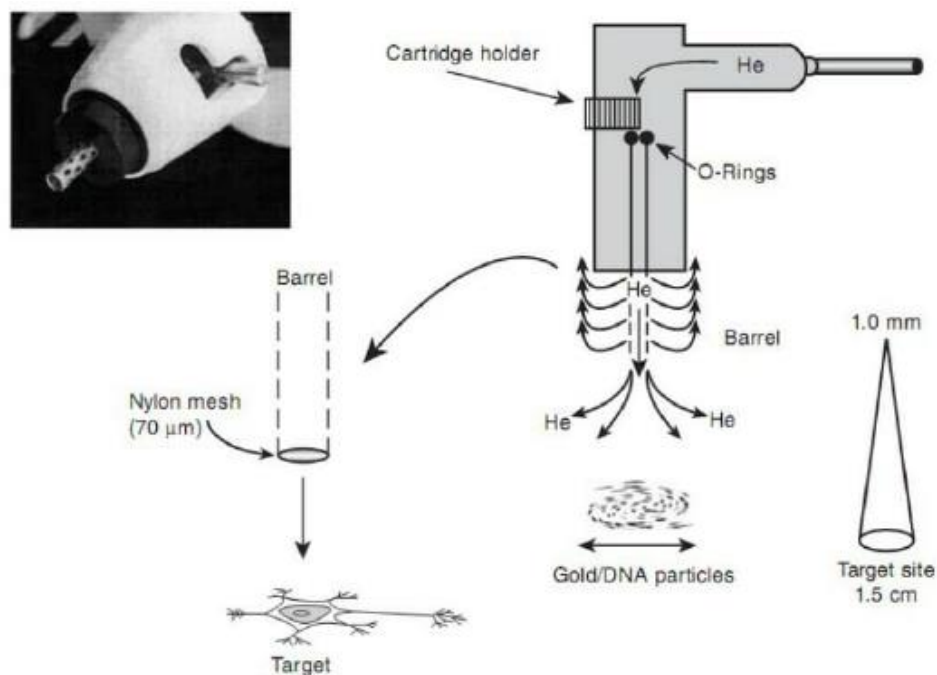
Таблица 1 - Преимущества и недостатки метода электропорации

Наименование метода	Преимущества	Недостатки
Электропорация клеточных суспензий	Достаточно высокая эффективность	Можно использовать только для клеточных культур
Электропорация <i>in vivo</i>		Экспрессия внесенных генов сильно снижается со временем
		Очень малый объем тканей, в котором производится трансфекция

Источник: [30]

Метод генного пистолета позволяет осуществлять трансфекцию единичных клеток. Для этого, ДНК сорбируют на наночастицы благородных металлов, к примеру, на золото или вольфрам, а затем при помощи «пистолета» с использованием либо электрического разряда, либо под давлением импульса газа, например гелия, выстреливают в трансфицируемые клетки.

Схема модифицированного генетического пистолета представлена на рисунке 4.



Источник: [30]

Рисунок 4 – Схема модифицированного генетического пистолета

Преимущества и недостатки данного метода представлены в таблице 2.

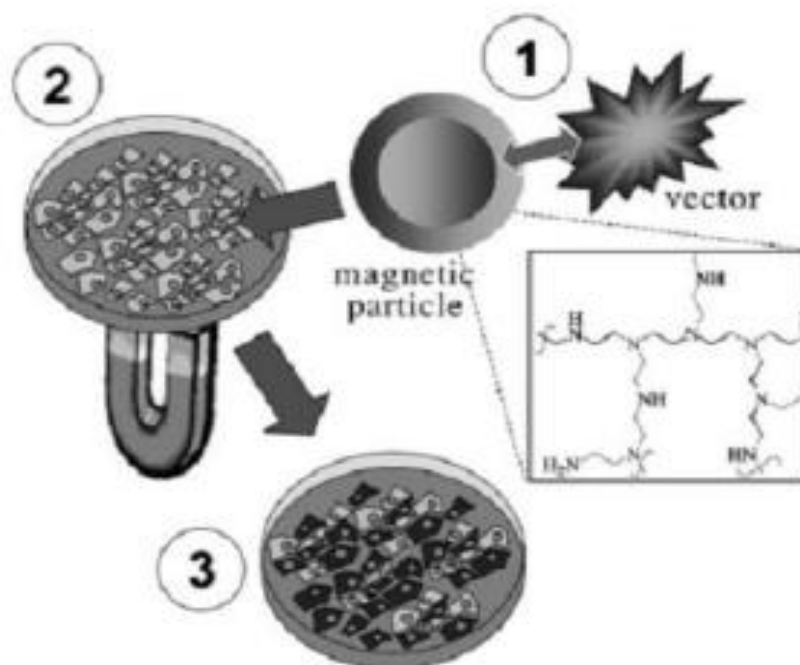
Таблица 2 - Преимущества и недостатки метода «генного пистолета»

Наименование метода	Преимущества	Недостатки
«Генный пистолет»	Метод прост в использовании	Вероятность механического повреждения клетки
	Требует небольшого количества ДНК (РНК)	Нельзя использовать <i>in vivo</i>
	Возможность использовать на срезах тканей и единичных клетках	

Источник: [30]

1.2.3 Метод магнетофекции и фототрансфекции

Данный метод представляет собой модификацию метода «генного пистолета», показанного ранее на рисунке 5. Действие метода представлено на рисунке 5.



Источник: [30]

Рисунок 5 – Принцип метода магнетофекции:

1 – намагниченные наночастицы, 2 – среда, омывающая клетки, 3 – чаша с трансформированными клетками

Суть метода магнетофекции заключается в том, что ДНК сорбируется на намагниченные наночастицы, далее суспензию этих наночастиц добавляют в среду, омывающую клетки, а далее трансфицирующие частицы помещаются примерно на 10 минут в магнитное поле, которое транспортирует наночастицы с молекулами ДНК внутрь клеток. Преимущества и недостатки данного метода представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Преимущества и недостатки метода магнетофекции

Наименование метода	Преимущества	Недостатки
магнетофекция	Возможность использования на срезах	Трудоемкость в изготовлении наночастиц
	Высокая скорость доставки конструкций – примерно 10 минут	Нельзя использовать <i>in vivo</i>

Источник: [30]

Сущность метода фототрансфекции заключается в том, что доставка ДНК осуществляется через поры в плазматической мембране, которые образуются при облучении небольшого участка клеточной мембраны короткой вспышкой лазера [17]. Данный метод демонстрирует отсутствие каких-либо отрицательных последствий на рост и деление клеток, а также показывает малое количество погибших клеток. Преимущества и недостатки метода фототрансфекции представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Преимущества и недостатки метода фототрансфекции

Наименование метода	Преимущества	Недостатки
фототрансфекция	Возможность вносить материал в различные места клетки	Трудоемкость
	отсутствие каких-либо отрицательных последствий на рост и деление клеток	Нельзя использовать <i>in vivo</i>

Источник: [30]

Данный метод дает возможность определения интенсивности флуоресценции и обработки изображений с того же микроскопа. А так же, существует возможность

безопасно и эффективно передать чужеродную ДНК в специфические типы клеток, например, в стволовые клетки.

1.2.4 Кальций-фосфатный метод

Кальций-фосфатный метод предполагает смешение ДНК с хлоридом кальция и добавление его в фосфатно-буферный раствор. При этом образуется осадок, который вносят в среду, омывающую клетки. Все эти комплексы из фосфата кальция и ДНК, поглощаются клетками, которые начинают впоследствии экспрессировать введенный ген.

Недостатками такого метода являются:

- высокая токсичность;
- низкая эффективность (от 1% до 5% комплексов достигает ядра);
- метод сложно использовать *in vivo* [30, 69].

1.3 Продуценты рекомбинантных белков и гетерологическая экспрессия

1.3.1. Системы экспрессии рекомбинантных белков и их применение

На сегодняшний день используются различные методы для введения чужеродных генов в клетки прокариот и эукариот при помощи различных способов трансформации: электропорации, бомбардировки микрочастицами золота или вольфрама и т. д., или при помощи различных вариантов биологической доставки: липидных конъюгатов - липосом, рекомбинантных вирусов и т. д. Конструирование и введение рекомбинантных гибридных молекул ДНК в прокариотические и эукариотические клетки с помощью векторов имеет множество преимуществ. Разработка на их основе различных систем экспрессии, обеспечивающих эффективное производство белков *in vitro* и *in vivo*, постоянно совершенствуется, расширяя круг задач. Кишечная палочка *Escherichia coli* - наиболее генетически, биохимически и физиологически изученный микроорганизм, поэтому основные работы по гетерологичной экспрессии выполняются на этих клетках. Однако, *E. coli* является условно-патогенным

микроорганизмом для человека, что может создавать определенные трудности при получении на ее основе, к примеру, фармацевтических препаратов [82].

Благодаря успехам генной инженерии созданные штаммы *E. coli* являются продуцентами целого ряда цитокинов. В малых дозах цитокины стимулируют клетки. Они применяются в клинической практике в виде сывороток для стимуляции или подавления клеток [74].

В настоящее время активно ведутся работы по созданию препаратов нового поколения с использованием генно-инженерных технологий. К настоящему моменту получены данные об успешном использовании препаратов, созданных на основе рекомбинантных белков синегной палочки, включающих аминокислотные последовательности белков OprF и OprI. Так, в Германии проведены клинические исследования на ожоговых больных рекомбинантного белка, включающего C-концевой фрагмент OprF (190-342 аминокислотные остатки) и OprI (21-83 аминокислотные остатки). Синтез данного гибридного белка происходил в клетках *E. coli*, которые несут плазмидную конструкцию со встроенным рекомбинантным геном с регуляторными участками для его экспрессии [44, 71]. На основе генов OprF и OprI ведутся разработки ДНК-вакцин на базе плазмидных векторов и с использованием аденовирусов. В настоящее время активно ведутся исследования по разработке вакцинных препаратов против синегнойной инфекции генно-инженерными методами [78].

Бактерия *Bacillus subtilis* по степени популярности и изученности следует за *E. coli*: на ее основе также конструируют штаммы-продуценты, секретирующие чужеродные белки из клеток. Бактерия *B. subtilis* не представляет угрозы для человека и животных, а также успешно освоена микробиологической промышленностью [82].

Однако бактерии как прокариотические организмы, не способны осуществлять посттрансляционную модификацию белков, характерную для эукариотических организмов, а вследствие условной патогенности прокариотических штаммов-продуцентов рекомбинантные белки могут содержать

примеси эндотоксинов, поэтому длительное применение рекомбинантных белков бактериальной природы сопровождается нежелательными побочными эффектами.

В связи с этим возникла настоятельная необходимость поиска других организмов для продукции белков человека и животных. Системы экспрессии, созданные на основе многоклеточных эукариотических организмов (культура клеток млекопитающих, трансгенные растения и животные) позволяют получать аутентичные гетерологичные белки. Существенным недостатком этих систем является достаточная сложность работы с культурами клеток и трудоемкость получения трансгенных растений и животных, что увеличивает стоимость получаемых рекомбинантных белков [68, 73].

Компромиссным решением можно считать использование системы экспрессии дрожжей. Дрожжи являются эукариотическими микроорганизмами, поэтому способны обеспечивать корректную посттрансляционную модификацию белков человека и животных. У дрожжей подробно изучены механизмы регуляции матричных процессов и метаболизма, при работе с ними используются стандартные методы генной инженерии и их легко культивировать на относительно дешевых субстратах [82].

В настоящее время «Ронколейкин» (рекомбинантный интерлейкин-2 человека), производимый ООО «БИОТЕХ» в г. Санкт-Петербург, зарегистрирован Фармкомитетом МЗ РФ в качестве лекарственного препарата. Несомненными достоинствами «Ронколейкина» являются практически полное отсутствие побочных эффектов при его применении, что объясняется использованием в качестве продуцента непатогенных дрожжей, которые не содержат токсических и пирогенных факторов, а также имеют относительно низкую стоимость препарата [83]. Эти факторы обусловили широкое применение «Ронколейкина» для лечения септических состояний, ряда онкологических и инфекционных заболеваний.

В настоящее время трансгенные растения так же широко используются как модели для изучения фундаментальных исследований по изучению физиологической роли растительных генов и для решения прикладных задач по созданию устойчивых форм сельскохозяйственных культур и продукции

рекомбинантных белков в растениях. Успех в этих направлениях, прежде всего, связан с эффективностью экспрессии перенесенного гена в растениях. Эффективность экспрессии трансгена обуславливается рядом следующих факторов:

- кодоновым составом трансгена;
- регуляторными элементами, контролирующими его экспрессию;
- интеграцией трансгена в определенные участки генома растений [81].

Однако одним из наиболее простых и быстрых путей решения проблемы обогащения животноводческих кормов белками является получение белка микробиологическим путем.

1.3.2. Микробиологический синтез белков для обогащения кормов и методы культивирования штаммов-продуцентов

Микроорганизмы отличаются высоким содержанием белка - до 60% сухой массы, сбалансированного по аминокислотному составу. Кроме того, микроорганизмы содержат углеводы, липиды, витамины, макро- и микроэлементы. Важным достоинством производства кормового белка на основе микроорганизмов является использование сельскохозяйственных отходов, возможность организации промышленного производства, отсутствие сезонности и зависимости от погодноклиматических условий [21, 38]. Таким образом, при использовании микроорганизмов в качестве продуцентов целлюлозолитических ферментов и кормового белка одновременно решаются две важные задачи - получение белковой массы и утилизация отходов растениеводства, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, которые могут быть источниками загрязнения окружающей среды [3, 5]. В отличие от бактериальных и дрожжевых клеток, которые продуцируют ДНК в количестве, вызывающем интоксикацию у животных, концентрация нуклеиновых кислот в грибном мицелии почти такая же, как в тканях растительного организма – от 1% до 4% от сухой массы. Однако в биомассе мицелиальных грибов синтезируется значительно меньше белков (от 20%

до 60% от сухой массы), чем в дрожжах, и у них относительно медленней происходит рост биомассы [11, 43].

В целях ускорения роста грибов проводится предварительная обработка растительного сырья, повышающая доступность его компонентов для утилизации микроорганизмами [24]. Чаще всего применяют:

- 1) кислотно-щелочной способ обработки целлюлозо- и лигнинсодержащих отходов,
- 2) отпаривание под давлением,
- 3) обработка аммиаком
- 4) обработка каустической содой [10, 23].

После такой обработки происходит полное или частичное разложение трудногидролизуемых полисахаридов и лигнина, что обеспечивает ускоренный рост грибной массы и сокращение сроков промышленного культивирования грибов (от 7 до 8 суток). В зависимости от способа подготовки растительного сырья для культивирования микроскопических грибов применяют и соответствующие технологии их выращивания. Для культивирования грибов на твердой питательной среде разработан метод твердофазной ферментации. Это гетерофазный процесс, который включает измельчение и обработку растительного сырья парами воды и аммиака, обогащение этого сырья минеральными веществами, посев и выращивание мицелия грибов в заданном режиме аэрации и поддержание оптимальной температуры [27].

Однако, при такой технологии культивирования грибов коэффициент использования растительного сырья невысокий, что предопределяет и сравнительно невысокий уровень содержания белка в выращиваемой грибной массе (от 20% до 30% от сухой массы) [79]. Так, прямое культивирование мицелиальных грибов на соломе и других отходах растениеводства обеспечивает включение углерода из этих источников в органическое вещество грибного мицелия от 17% до 25%. Более высокий коэффициент использования сырья обычно достигается при выращивании грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной

промышленности [14]. В пересчете на сухую массу количество протеина в грибном мицелии, культивируемом на среде с высокой влажностью, может составлять от 50% до 60%. Для более эффективной переработки сырья в некоторых случаях применяется одновременное культивирование бактерий и грибов. Разработаны технологии по переработке в грибной белок торфа, навоза [1].

Практическое использование термофильных мицелиальных грибов в технологических процессах имеет преимущества перед мезофильными микроорганизмами [6]. Недостатком использования для ферментации многих видов мезофильных грибов является их отношение к группе условно-патогенных грибов. Способность многими видами плесневых грибов образовывать обильное спороношение может привести к пылению субстрата, что создает неблагоприятные условия для работы персонала, приводит к развитию профзаболеваний. Температурный режим, при котором могут существовать и развиваться мезофильные грибы, не исключает развитие патогенной и условно-патогенной микобиоты. Кроме того, многие виды атоксигенных термофильных грибов, обладая более высоким уровнем образования целлюлолитических ферментов и биомассы, являются перспективными продуцентами кормового источника белка, витаминов, липидов и других физиологически активных метаболитов с использованием дешевых растительных субстратов [87]. Основными критериями в селекции штаммов мицелиальных грибов для производства обогащенных грубых кормов и различных растительных отходов являются следующие:

- атоксигенность,
- высокая скорость роста на субстрате (высокая белоктрансформирующая активность),
- высокое содержание белка с набором незаменимых аминокислот,
- степень безвредности при производстве обогащенного корма и его скармливании животным,
- стабильность и технологичность при изготовлении посевного материала культуры,
- проведение твердофазной ферментации [27].

Так, например, известен способ переработки отходов растительного сырья, предусматривающий жидкофазную ферментацию с использованием термофильного штамма гриба *Myceliophthora thermophila* F-2109, гидролиз растительного сырья жидкофазной фракцией, полученной при жидкофазной ферментации и содержащей ферменты, обеспечивающие деградацию крахмала, целлюлозы и лигнина, и твердофазную ферментацию, осуществляемую на смеси продуктов жидкофазной ферментации и ферментативного гидролиза растительного сырья в слое смеси, не превышающем 15 мм. При этом переработку осуществляют в условиях порционного замещения целевого продукта свежей средой [2, 41, 83]. Способ позволяет перерабатывать 27 кг опилок и получать 27,5 кг ферментированного продукта, обогащенного легкодоступными углеводами и биомассой грибов, а производительность переработки (биodeградации) растительного сырья при использовании гидролизного аппарата емкостью 3 дм³ достигает 5,4 кг/сутки.

Таким образом, путь прямой трансформации полимеров грубых отходов сельского хозяйства в белок и другие полезные метаболиты грибной массы решает вопрос обогащения белком и другими биологически активными метаболитами целлюлозосодержащих субстратов. Однако для выбранного штамма-продуцента всегда остается необходимость либо увеличения эффективности имеющихся ферментативных систем методами метаболического инжиниринга для более глубокой переработки субстратов, либо создания новых метаболитов в виде рекомбинантных белков и ферментов [2. 5].

1.3.3. Поиск ценных протеинов для биотехнологического обогащения кормов

В последние годы во многих странах мира проводятся интенсивные исследования семян амаранта, как источника наиболее сбалансированного белка по аминокислотному составу. Семена и фитомасса амарантовых представляют собой прекрасный корм для животных в свежем, сушеном или заsilосованном состоянии, а также высокотехнологичное сырье для извлечения белка и

сопутствующих ценных компонентов, таких как пектин, пигменты, витамины, пищевые красители и др. Семена амаранта содержат в среднем от 15% до 18% белка, от 5% до 8% масла и от 3,7% до 5,7% клетчатки, что выше, чем у большинства зерновых культур [18].

Родиной амаранта является Центральная и Южная Америка, где он уже тысячелетия служит пищевой культурой для местных народов. Амарант устойчив против болезней, засухи, жары. Хорошо приспосабливается к новым условиям, в том числе и таким, которые для других растений невыносимы. Семейство амарантовых представлено 65 родами и 850 видами, распространёнными главным образом в субтропических областях земного шара. Все они являются древними зерновыми культурами. Именно поэтому за последние 25 лет многие виды амаранта интродуцируются и широко используются в качестве пищевых, кормовых и лекарственных культур в странах Америки, Европы, Азии и Африки [15].

В отличие от низкокачественных белков зерновых злаков, ценность белка амаранта определяется преобладанием легкорастворимых в воде и слабых солевых растворах фракций альбуминов и глобулинов, не образующих клейковины, с повышенным содержанием незаменимых аминокислот [29]. При применении зерна амаранта в кормлении домашней птицы повышается яйценоскость кур-несушек, ускоряется рост цыплят, повышается производство мяса птицы. Особый интерес зерно амаранта как корм, представляет при выращивании мелких пернатых: перепелов, попугаев и другой мелкой птицы. Однако стоит отметить, что семена амаранта, имеющие тёмную оболочку, включают в себя небольшое количество токсичных веществ. Исходя из этого факта, для пищевых и кормовых целей, в большинстве случаев, подходят сорта только со светлой окраской семян [15, 20]. Следует учитывать способность амаранта к переопылению сортов.

По содержанию незаменимой аминокислоты - лизина, амарант в 2 раза превосходит пшеницу и в 3 раза кукурузу. При недостатке лизина пища плохо усваивается и белок проходит через организм транзитом. По содержанию незаменимых аминокислот - треонина, фенилаланина, тирозина и триптофана структура амаранта приравнивается к белку женского молока. Амарант имеет

наибольшее совпадение с теоретически рассчитанным идеальным белком. Для сравнения, коэффициент оценки к идеальному белку:

- амарант - 75,
- коровье молоко - 72,
- соя - 68,
- ячмень - 62,
- пшеница - 60,
- кукуруза - 44,
- арахис – 32.

В рецептах комбикормов, произведенных по традиционной технологии, доля зерновых компонентов составляет от 60% до 80% [16, 31]. При этом интенсивное увеличение спроса влечет за собой сокращение мировых запасов зерна, которые уже невозможно восполнить увеличением производства. В то же время, во многих хозяйствах имеются и постоянно накапливаются большие запасы малоиспользуемых отходов растениеводства, животноводства, зерноперерабатывающих и других производств, характеризующиеся низкой кормовой ценностью из-за наличия трудногидролизуемых полисахаридов и невысокого содержания усваиваемого белка, которые после соответствующей обработки могут приобретать кормовые свойства в 1,5 - 3,0 раза превосходящие фуражное зерно хорошего качества [9].

Большинство кормов, используемых в животноводстве, не содержат в достаточном количестве белков и витаминов [28]. Даже такие ценные корма, как кукуруза и сахарная свекла, дающие максимальное количество кормовых единиц с гектара, богаты углеводами, но не содержат достаточного количества азотистых веществ, что приводит к дефициту кормового белка. Этот дефицит покрывается увеличением производства растительного протеина, содержащегося в сельскохозяйственных кормовых культурах: зерне, люцерне, выпуском рыбной и мясной муки, сухих молочных продуктов [25]. Если содержание белков в растительной массе, используемой для кормления сельскохозяйственных животных, ниже требуемой нормы, то во избежание перерасхода кормов и

повышения себестоимости животноводческой продукции количество белка в корме балансируют путем добавления белковых концентратов [22].

В животноводстве для обогащения кормов используют обычно кукурузный глютен, в котором содержится от 40% до 65% протеина – проламинов, называемых зеинами. По энергии 1 кг глютена эквивалентен 7 кг кукурузы, а по протеину - 1 кг рыбной муки. Добавление глютена кукурузы в состав кормов до 10% позволяет частично заменять дорогостоящую рыбную муку. Проламины кукурузы (зеины) отличаются между собой по растворимости и структурным особенностям [9]. Гетерогенность молекул проламинов в основном обусловлена варьированием числа повторяющихся последовательностей и модификацией в них аминокислотных остатков.

Несмотря на наличие в геноме кукурузы большого числа генов зеинов (от 110 до 130 генов), анализ к-ДНК библиотеки развивающегося эндосперма кукурузы *Zea mays* показал наличие ограниченного количества специфических матричных РНК, соответствующего разному уровню экспрессии генов белковых семейств α -, γ -, или δ -зеинов [35, 65]. Было установлено, что γ -зеины синтезируются в количестве не более 15% от общего числа транскриптов перед тем, как начнут синтезироваться основные запасные белки - α - и δ -зеины, вероятно, обеспечивая им защиту от преждевременного ферментативного и механического разрушения в процессе длительного хранения зерна. Из основных форм запасных белков наиболее высокий уровень экспрессии в период созревания зерна кукурузы был обнаружен у α -зеинов (около 30% от общего числа транскриптов) с молекулярной массой 19 кДа ($\alpha Z19B1$) и 22 кДа ($\alpha Z22z1$), тогда как общее количество кодирующих α -зеины последовательностей в разных хромосомах генома кукурузы насчитывается от 75 до 100. α -Зеины – маленькие белки, имеющие структурную идентичность от 75% до 95% внутри подгрупп, а последовательности белков разных подгрупп идентичны между собой лишь от 40% до 55%. Все белки имеют одинаковые повторы, обогащенные глютаминовыми остатками, кодирующие нуклеотидные последовательности которых имеют наиболее высокую вероятность рекомбинаций и мутаций [40, 45].

Ранее предпринимались попытки с помощью генетической инженерии модифицировать гены, кодирующие проламины, с целью повышения в них содержания положительно заряженных аминокислот (лизина, аргинина), и, таким образом, увеличения их биологической ценности [59]. Кроме того, имеются результаты модификации высокомолекулярных глютеинов зерна пшеницы для улучшения свойств муки за счет контролирования их клейковинообразующих свойств [85]. Этого можно достичь путем введения в состав субъединиц глютеинов искусственные аминокислотные повторы с различным аминокислотным составом и/или длиной последовательности. Введение в состав природного глютеина пшеницы повторы, такие как гексамер P/SGQGQQ, наномер GY/HYPTSPQQ, гексамер+тример PGQGQQ+GQQ, способствует образованию глютеинового олигомера с S-S связями с N-конца субъединиц, содержащего от 10 до 150 повторов, преимущественно 15 повторов, что от 14,5% до 30,7% меньше по молекулярной массе, чем природный белок, и от 17,2% до 36,6% короче по последовательностям повторов субъединиц D \times 5. Это улучшает вискоэластичные свойства муки из зерен такой модифицированной пшеницы [85].

Кроме того, в отличие от бактерий мицелиальные грибы могут обеспечить рекомбинантному белку эукариотического происхождения, каким является белок семян амаранта A1 и кукурузы (зеин), необходимую постраницационную модификацию и фолдинг, что увеличит биологическую ценность продукта.

Разработка технологий рекомбинантной ДНК с использованием мицелиальных грибов в качестве штаммов-продуцентов является перспективной для получения ценных белковых макромолекул в производстве и сельском хозяйстве [26].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Поиск оптимального маркера трансформации для термофильных и морских штаммов мицелиальных грибов

Оптимальными маркерами трансформации являются гены, ответственные за резистентность микроорганизма к тому или иному антибиотику, чтобы иметь возможность определять наличие трансформационного события клеток при культивировании их на селективной среде с антибиотиком. Поэтому поиск оптимального маркера трансформации проводили путем исследования антибиотикочувствительности микроорганизмов.

В работе использовали штаммы мицелиальных грибов, выделенных из природных источников, с высокой целлюлозолитической активностью, для возможности их дальнейшего применения в технологиях переработки растительных субстратов и получения белково-углеводных кормов.

Сбор образцов навоза, птичьего и кроличьего помета проводился стерильным шпателем в стерильные полиэтиленовые пакеты в период его самонагревания до 50°C, когда происходило активное развитие представителей термофильных грибов, а рост мезофильных и термотолерантных грибов подавлялся.

Выделение грибов проводилось чашечным методом на твердых агаризованных средах с использованием метода прямого посева (метод Ваксмана), а также метода серийных разведений. Метод прямого посева подразумевает равномерное распределение кусочков исследуемого образца по поверхности твердой питательной среды в чашках Петри. При использовании метода серийных разведений брали навеску исследуемого образца 10 г, помещали в стерильную воду объемом 90 мл и тщательно встряхивали (разведение 1/10). Далее отбирали 10 мл из полученной суспензии и переносили в соответствующий объем стерильной воды и т.д., получая серию разведений (1/100, 1/1000 и т.д.). Посев на чашки Петри производили из суспензий с разведением 10-10³. Чашки с посевами инкубировали в термостате при температуре 42°C. Выбранный температурный режим позволяет

исключить прорастание широко распространенных мезофильных грибов и способствует выделению представителей экологической группы термофильных микромицетов [25].

Для выявления наиболее полного видового состава термофильных грибов был использован ряд питательных сред следующего состава:

1. Агаризованное сусло: сусло - 800 мл, водопроводная вода - 200 мл, агар-агар - 16 г.

2. Среда Чапека: NaNO_3 – 3 г, KH_2PO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, KCl – 0.5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, сахароза – 30, агар-агар – 16, дистиллированная вода – 1000 мл.

3. Глюкозно-дрожжевой экстракт: дрожжевой экстракт – 5 г, глюкоза – 10, агар-агар – 16, водопроводная вода – 1000 мл.

4. Крахмально-дрожжевой экстракт: порошкообразный дрожжевой экстракт – 4 г, KH_2PO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, растворимый крахмал – 15, агар-агар – 16, вода (3/4 – водопроводной, 1/4 – дистиллированной) – 1000 мл.

5. Агар с бенгальским розовым: папайновый гидролизат соевой муки – 5 г, декстроза – 10, KH_2PO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, бенгальский розовый – 0.05, агар-агар – 15, дистиллированная вода – 1000 мл, pH 7.2.

Все среды автоклавировались при температуре 112°C в течение 30 мин (0.5 атм). Перед разливом в чашки Петри в среды добавлялись антибиотики (0.5 г стрептомицина и 500000 ед. пенициллина) для подавления роста бактерий. Чашки Петри после посева субстратов помещались в термостат и инкубировались при 42°C . Для поддержания влажности на постоянном уровне на период инкубации в термостат помещался сосуд с дистиллированной водой [36, 72]. Начиная с 3 дня инкубации чашки просматривались визуально на предмет роста колоний грибов, которые по мере появления отсеивались в чистую культуру в заранее приготовленные пробирки со скошенным сусло-агаром.

Идентификация выделенных изолятов проводилась методом микроскопирования при увеличении $\times 600$ и $\times 800$ на основе морфолого-культуральных признаков с использованием общепринятых определителей и

оригинальных статей [52, 67]. Для микроскопирования были приготовлены временные препараты методом раздавленной капли. Для идентификации грибов, имеющих растворяющиеся структуры и цепочки конидий, препараты готовились на основе смеси спирта, глицерина и воды в соотношении 1:1:1. Уточнение таксономической принадлежности и филогенетического положения грибов проводилось на основе изучения молекулярно-генетических признаков с использованием метода мультилокусного анализа (генов ITS, бета-тубулина) с использованием пар специфических праймеров:

1) ITS1 - 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4 - 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3';

2) Bt2a - 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3' and Bt2b - 5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3';

и последующим nBLAST-анализом полученных результатов в базе данных NCBI [49].

Для выделения геномной ДНК 0,5 г клеток культуры гриба разрушали жидким азотом и экстрагировали в 5 мл 4М гуанидина изотиоцианата и разделяли на 2 пробирки. В каждую пробирку добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, перемешивали, центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин. К водной фазе добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (рН 5.2) и равный объем изопропанола (для осаждения). Осадок ДНК собирали центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин, несколько раз промывали 70% этанолом, затем один раз 96% этанолом (чтобы быстрее высушить), высушивали при комнатной температуре, либо в термостате при 37°C, и растворяли в 500-1000 мкл бидистиллированной воды.

Определение антибиотикочувствительности штаммов мицелиальных грибов проводили следующим образом: штамм мицелиального гриба выращивали на минимальной среде Вогеля (ММ) или картофельно-глюкозном агаре (PDA) в чашках Петри при 45°C в течение 15 дней для сбора конидий. Чашки заливали 10 мл 0,05% Tween 80 и выдерживали в течение 15 мин. Конидии тщательно собирали с поверхности мицелия с помощью специальной 5-мл пипетки, а затем переносили

в пробирку объемом 15 мл и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин для удаления мицелия. Супернатант сливали, оставшиеся в осадке конидии промывали ресуспендированием в 5 мл стерильной воды.

Смесь зрелых конидий в концентрации 10^3 была высеяна на чашках со средой ММ, содержащей 2% сахарозы и различные концентрации антибиотиков:

- 1) 1000, 1500, 2000 мкг/мл - для канамицина (Кан);
- 2) 1, 2, 5, 10, 12,5, 25, 50 мкг/мл - для гигромицина (Нуг)
- 3) 50, 100, 200 мкг/мл для фосфинотрицина (РРТ).

После пятидневной инкубации морских штаммов мицелиальных грибов при температуре 22⁰С, и при инкубации наземных термофилов при температуре 45⁰С, устойчивые к антибиотику колонии были видны на чашках.

2.2 Получение генетической конструкции на основе растительной плазмиды pSAT

Полноразмерную последовательность гена фосфотрансферазы гигромицина В (*hph*) *E.coli*, которая отвечает за устойчивость клетки микроорганизма к гигромицину, получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ДНК плазмиды pVECK2000 [51] в качестве матрицы и следующих геноспецифических праймеров:

- 1) прямой Hph-D 5'-GTC CTC GAG CAT GAA AAA GCC TGA ACT C-3' (сайт рестрикции XhoI подчеркнут),
- 2) обратный Hph-R 5'-GTC TCT AGA CCT ATT CCT TTG CCC TCG GAC G-3' (сайт рестрикции XbaI подчеркнут).

Фрагмент ДНК, кодирующий промотор TrpC, получали с помощью набора праймеров с использованием плазмиды pPK2BarGFPD [46] в качестве матрицы, которая была любезно предоставлена доктором Чаогуандом Тяном (Микробная биотехнология, Институт промышленной биотехнологии Тяньцзинь, Китайская академия наук, Тяньцзинь 300308, Китай):

- TrpC-D: 5'-GTC ACC GGT GGT TAC TTC СТА ATC GAA G-3' (сайт рестрикции AgeI был подчеркнут);

– TrpC-R: 5'-GTC CCA TGG TCG ACA GAA GAT GAT ATT G-3 '(сайт рестрикции NcoI подчеркивается)

Промотор TEF получали с использованием pPK2BarGFPD и следующего набора праймеров:

1 TEF-D: 5'-GTC ACC GGT GGG TAG CAA ACG GTG GTC A-3 '(сайт рестрикции AgeI подчеркивался),

2 TEF-R: 5'-GTC CCA TGG GTT TGA CGG TTG TGT ATG G-3 '(сайт рестрикции NcoI подчеркнут).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием ранее описанных условий [64], в результате чего получали фрагменты ДНК известной длины.

Для построения векторов экспрессии использовали плазмиду pSAT6-MCS, содержащую тандемный промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) 35S, лидер вируса табачной мозаики (TEV) и терминатор вируса мозаики цветной капусты CaMV 35S [63]. Ген устойчивости к фосфинотрицину *hph* субклонировали как рестрикционный фрагмент XhoI-XbaI в те же сайты кольцевой плазмиды, в результате чего была получена конструкция pSAT6-35S-*hph*. После этого тандемный промотор CaMV 35S в плазмиде pSAT6-MCS вырезали как фрагмент AgeI-NcoI и заменили его тем же фрагментом промотера TrpC, либо промотера TEF для получения конструкций pSAT6-TrpC-*hph* и pSAT6-TEF-*hph* соответственно.

Полученные конструкции: pSAT6-35S-*hph*, pSAT6-TrpC-*hph* и pSAT6-TEF-*hph* были проверены на отсутствие мутаций секвенированием ДНК, как описано ранее [64] в Инструментальном центре биотехнологии и Генной инженерии Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН с использованием генетического анализатора ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City CA, США).

Сконструированный вектор экспрессии TrpC-*hph* из плазмиды pSAT6-TrpC-*hph* дополнительно вырезали как фрагмент P1-PspI и субклонировали в бинарный вектор pPZP-RCS2-EGFP [60], содержащий левую и правую фланкирующие области Ti-плазмиды и ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP) под контролем

тандемных промоторов CaMV 35S и терминатора. Конечная конструкция pPZR-RCS2-EGFP-hph использовалась для одновременной доставки двух генов в клетки *Th. thermophila* посредством электропорации.

2.3 Оптимизация условий трансформации мицелиальных грибов

Исследование эффективности методов трансформации биотехнологически значимых штаммов мицелиальных грибов проводили на примере модельного штамма термофильного гриба *Thermothelomyces thermophila* F-859 (ранее назывался *Myceliophthora thermophila* F-859), депонированного во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов [84]. Среди остальных штаммов проводили скрининг на способность к генетической трансформации с использованием оптимальной генетической конструкции и оптимального способа трансформации для штамма *Thermothelomyces thermophila* F-859.

Так как мицелий грибов может быть дикариотическим, формирующимся путем слияния гиф, эффективнее использовать для трансформации конидии, дающие генетически однородную колонию.

Культуру *Th. thermophila* выращивали на агаризованной минимальной среде Вогеля [42] с добавлением 2% сахарозы (v/v) на чашках Петри (10 x 1,5 см) в течение 7-15 дней в воздушном термостате при 45°C. Для отделения конидий от мицелия с помощью стеклянной Пастеровской пипетки с одной чашки производили смыв стерильной водой с добавлением 0,05% Tween 80 (15 мл) и помещали на стерилизованную стекловату, размещенную сверху встроенной мембраны стерилизованной ультрацентрифужной пробирки (Milipore, 15 мл, 50 kDa). Ультрацентрифужные пробирки центрифугировали при 800 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре, затем промыли стерильной водой при тех же условиях центрифугирования. После этого в ультрацентрифужную пробирку добавляли 3 мл стерильной воды и пипетировали для суспендирования конидий. Суспензию конидий переносили в стерильную пробирку для определения концентраций колоний-образующих единиц (конидий). Для использования в

трансформации суспензию конидий хранили в течение нескольких дней при 4°C или при -80°C с добавлением 30% глицерина для более длительного хранения.

Трансформацию конидий проводили методом электропорации и с использованием агробактерий.

При методе электропорации, конидии подвергались электропорации двумя методами:

1) Суспензию конидий переводили в охлажденный буфер YED (1% дрожжевой экстракт, 1% глюкозы в 20 mM HEPES, pH 8.0), и 25 мл полученной суспензии инкубировали в течение 1 часа при 45°C на роторном шейкере при 100 об / мин. Затем конидии центрифугировали, осадок ресуспендировали в 2,5 мл буфера для электропорации (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 270 mM сахароза, 1 mM ацетат лития), доводили до плотности 1×10^9 в 1 мл и выдерживали на льду. Для электропорации 10 мкг плазмидной ДНК добавляли к 150 мкл охлажденной суспензии конидий и доводили до конечного объема 200 мкл стерильной дистиллированной воды. Смесь инкубировали на льду 15 мин и переносили в кювету 0,2 см. Электротрансформацию проводили при напряженности электрического поля 1 кВт, емкости 25 мкФ и сопротивлении 400 Ом с использованием системы Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad). После электропорации в кюветы добавляли 1 мл охлажденного во льду буфера YED и 1 мл ледяного 50ММ маннита, а конидиальную суспензию переносили в стерильный фалькон на 10 мл, выдерживали на льду 15 мин, затем инкубировали при 45°C в течение 90 мин на роторном шейкере при 100 об/мин. Трансформированные конидии высевали на чашку с картофельно-декстриновой средой с добавлением антибиотика гигромицина (12,5 мкг/мл и 10 мкг/мл) в течение 5 дней при 45°C. После отбора на антибиотик трансформанты переносили в среду без гигромицина.

2) Суспензию конидий доводили до плотности 1×10^6 в 5 мл буфера для электропорации (1 mM HEPES pH 7.0, 50 mM маннитола, 0.01% Tween-20). 120 мкл суспензии конидий помещали в 0,2 см кювету и выдерживали на льду. Затем в суспензию добавляли 10 мкг плазмиды и подвергали воздействию электрического импульса по схеме: 2 импульса в 1 мсек при 1,7 кВт с интервалом в 5 сек. После

электропарации конидии ресуспендировали в 1 мл охлажденного раствора 0,5 М маннитола и выдерживали на льду в течение 10 мин. Трансформированные конидии высевали на чашку с картофельно-декстриновой средой без селекции и инкубировали в течение 7 дней при 45 С. Выросшие колонии переносили на чашки с той же средой с добавлением антибиотика (гигромицина 100 мкг/мл) и инкубировали столько же. После селекции на антибиотике предположительные трансформанты переносили на среду с меньшей концентрацией гигромицина (80 мкг/мл) для увеличения скорости роста колоний. Подросшие колонии пересевали на среду с другим селективным фунгицидом соответственно используемой плазмиды для трансформации.

Трансформанты, несущие рекомбинантные плазмиды pSAT6-35S-hph, pSAT6-TrpC-hph и pSAT6-TEF-hph, идентифицировали методом ПЦР-анализа с парными праймерами Hph-D/R, либо по флуоресцентному свечению GFP в случаях использования плазмиды с репортерным геном GFP, для определения hph.

Для трансформации грибов посредством агробактерий рекомбинантный бинарный вектор переносили в клетки агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* штамма ЕНА 105 с использованием стандартного метода электропорации клеток [19].

В качестве бинарного вектора использовали плазмиду pPZP-RCS2, в состав которой входят:

- область Т-ДНК, фланкированная 25 п.н. повторами (RB и LB);
- ген устойчивости к канамицину - Npt II (неомицин-фосфотрансфераза) под контролем промотора и терминатора генов опинового синтеза (pNos и Nos 3');
- селективный маркер устойчивости к спектиномицину (SpR) и стрептомицину (StR), кодируемый транспозоном кишечной палочки (Tn7).

В области Т-ДНК вектора pPZP-RCS2 так же располагаются сайты рестрикции «homing» эндонуклеаз. Соответствующие сайты рестрикции фланкируют 35S промотор и терминатор в кассетном векторе pSAT6-EGFP-N1. Вектор pPZP-RCS2 и рекомбинантный вектор pSAT6-EGFP-N1, содержащий вставку гена глютенowego белка, подвергали рестрикции при помощи «homing»

эндонуклеазы PI-PspP I. Полученные фрагменты лигировали с использованием ДНК лигазы фага T4 по протоколу фирмы-производителя (СибЭнзим). Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *Escherichia coli* XL1Blue химическим способом с CaCl₂. Отбор колоний проводили на бактериальной среде LB, содержащей селективный антибиотик спектиномицин/стрептомицин (300/200 мг/л). Для скрининга полученных колоний использовали ПЦР с праймерами 253D-EcoRI и 253R-ApaI. Колонии, давшие положительный результат были пересажены на свежие питательные среды и использованы для выделения плазмидной ДНК методом щелочного лизиса [19]. Для подтверждения наличия вставки плазмиды были подвергнуты рестрикции. При помощи электропорации рекомбинантный вектор pPZP-RCS2 переносили в клетки агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* штамма ЕНА 105, которые в дальнейшем использовали для трансформации грибов.

Единичную колонию *A. tumefaciens*, несущую бинарный вектор, инокулировали в среду LB, содержащую спектиномицин/стрептомицин (300/200 мг/л) и культивировали на шейкере при 250 об/мин при 28⁰С в течение 12-16 ч до оптической плотности 0,5-1,0 при 600 нм. Клетки центрифугировали, отмывали дважды средой с индуктором – ацетосерингоном, затем разводили до значения плотности 0,15 при OD600. Культуру растили при 28⁰С на шейкере при 250 об/мин в течение 6-8 ч до оптической плотности 0,5–0,8 при OD600. Аликвоту 100 мкл культуры *A. tumefaciens* смешивали с аликвотой конидий *Th. thermophila* в равной пропорции и распределяли на той же агаризованной среде с индуктором и накрывали целлофаном. После сокультивирования при 28⁰С целлофан переносили на чашку с минимальной средой Вогеля (ММ), содержащей 100 мг/мл фосфинотрицина и 300 мг/мл цефотаксима (Sigma-Aldrich), затем сверху покрывали агаризованной средой (ММ), содержащей 2% сахарозы и 100 мг/мл фунгицида и культивировали при 45⁰С. Трансформанты появлялись на 3 день культивирования [19].

2.4 Идентификация трансформантов

Трансформанты, несущие рекомбинантные плазмиды pSAT6-35S-hph, pSAT6-TrpC-hph и pSAT6-TEF-hph, идентифицировали методом ПЦР-анализа [77] с парными праймерами Hph-D/R, либо по флуоресцентному свечению EGFP в случаях использования плазмиды с репортерным геном *egfp*, для определения экспрессии гена устойчивости к гигромицину *hph*.

2.5 Митотическая устойчивость трансформантов

Для оценки митотической стабильности 20 случайно выбранных трансформантов культивировали чашках Петри без антибиотика в течение семи дней. Мицелий с краев культур переносили на чашки со свежей средой и выращивали в течение еще 7 дней. После повторения этой процедуры в течение 5 генераций колоний, прорастающий мицелий из каждого трансформанта переносили на чашки с картофельно-глюкозным агаром (PDA), содержащим 12,5 мкг/мл гигромицина.

2.5.1 Лазерная конфокальная визуализация рекомбинантных белков, слитых с флуоресцентным белком EGFP

Мицелий с конидиями 7-дневного *Th. thermophila*, несущий плазмидную ДНК pPZP-RCS2-EGFP-hph, использовали для анализа. Ткань размещали в 100 мкл среды на покровных стеклах (50 × 50 мм). Обнаружение флуоресценции EGFP проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия) и LSM 710 LIVE в Инструментальном центре биотехнологии и геной инженерии (FSCEATB ДВО РАН). Для просмотра экспрессии EGFP использовали длину волны возбуждения 488 нм. Интенсивность аргонового лазера составляла 4% от максимального значения. Отдельные изображения EGFP были созданы с использованием LSM Image Browser и проанализированы с помощью программного обеспечения ZEN 2011 LightEdition для суммирования одиночных оптических срезов (максимальная проекция). λ-

Сканы всех длин волн всего спектра были получены для контрольного мицелия (нетрансформированного), чтобы исключить любую аутофлуоресценцию.

2.6 Получение плазмид с генами рекомбинантных белков

Общая РНК была выделена из проростков семян растений *Zea mays* и *Amaranthus hypochondriacus* с использованием метода LiCl как описано ранее [64]. Синтез первой цепи кДНК проводили с помощью набора MMLV RT [89] в соответствии с инструкциями производителя. Для амплификации полноразмерной последовательности альфа-зеина 19 кДа *Z. mays* [88] ПЦР проводили с геноспецифическими праймерами:

- прямой Z19D 5'-АТА GCC ATG GCA GCC AAA АТА ТТТ TGC-3' (сайт рестрикции NcoI подчеркнут);
- обратный Z19R 5'-GAC TCT AGA CCT AAA AGA GGG CAC CAC-3' (сайт рестрикции XbaI подчеркнут).

Чтобы амплифицировать полноразмерную последовательность альбумина А1 из семян амаранта *A. hypochondriacus* [88] использовали пару праймеров:

- 1) A1D 5'-АТА GCC ATG GCG GGA ТТА ССА GTG-3' (сайт рестрикции NcoI подчеркнута),
- 2) A1R 5'-GAC TCT AGA CCT AGT TGT TGG АТС-3' (сайт рестрикции XbaI подчеркнут).

ПЦР проводили в следующих условиях: 10x Encyclo буфер, 50x смесь полимераз Encyclo («Encyclo PCR kit», Евроген, Москва), 50x смесь dNTP (10 mM каждого), смесь праймеров (5 μM каждого), 20 нг ДНК. Процесс амплификации состоял из следующих стадий: 30 циклов ПЦР (15 с – 95°C, 15 с - 55°C, 1 мин – 72°C) и инкубация 10 мин при 72°C. После амплификации ПЦР-продукт очищали электрофоретически в 1% агарозном геле. Фрагмент (1 мкг) обрабатывали рестриктазами NcoI и XbaI в оптимальном буфере (Thermo Fisher Scientific) в течение 24 ч, затем ферменты удаляли из реакционной среды по стандартной методике фенолом (1:1) [58.]. В водную фракцию, содержащую фрагмент, добавляли 1/10 объема 0,3 М ацетата Na, pH 5,2, и 1/2 объема изопропилового

спирта и оставляли на -20°C в течение 30 мин. Затем центрифугировали при 18000 об/мин в течение 20 мин, осадок промывали 70% этанолом и высушивали при комнатной температуре. Осадок растворяли в 20 мкл деионизованной воды. Для сравнения нуклеотидной последовательности полученного фрагмента с последовательностью целевого гена проводили секвенирование с использованием смеси флуоресцентно-меченных терминаторов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit по методике производителя [33].

Для получения рекомбинантных конструкций за основу использовали плазмиды серии pSAT: pSAT1-MCS и pSAT4-MCS [63], каждая из которых содержит промотор и терминатор 35S мозаики цветной капусты (CaMV), и участок полилинкера для встраивания чужеродного гена. Кодированные последовательности (гены) запасных белков альфа-зеин 19kDa из *Z. mays* (Z19) и глобулин A1 из амаранта *A. hypochondriacus* (AhA1) субклонировали в виде фрагментов NcoI-XbaI в те же сайты полилинкеров кольцевых плазмид pSAT1-MCS и pSAT4-MCS соответственно для получения рекомбинантных плазмид pSAT1-35S-Z19 и pSAT4-35S-AhA1.

Получение рекомбинантных конструкций проводили по следующей схеме: 2 мкг плазмидной ДНК pSAT1-MCS или pSAT4-MCS обрабатывали рестриктазами NcoI и XbaI в соответствии с методикой, описанной выше, и из полученного гидролизата выделяли векторную часть плазмиды в 1% геле легкоплавкой агарозы. Полученный фрагмент гена Z19 или AhA1 и векторную часть плазмиды pSAT1-MCS или pSAT4-MCS, соответственно, сшивали при помощи лигазной реакции в 50 мкл буфера для лигирования согласно инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific). 10 мкл реакционной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* Rosetta (DE3). Трансформанты высевали на LB-агар, содержащий 50 мкг/мл ампициллина. После инкубирования в течение 16 ч при 37°C клоны отсеивали, выделяли плазмидную ДНК и анализировали на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. Отбирали плазмидную ДНК pSAT1-35S- Z19, содержащую последовательность Z19, или ДНК pSAT4-35S-AhA1.

Кроме того, из плазмид pSAT1-35S-Z19 и pSAT4-35S-AhA1 тандемный промотор CaMV 35S вырезали как фрагмент AgeI-NcoI и заменяли фрагментом AgeI-NcoI промотора TEF, в результате чего получили конструкции pSAT1-TEF-Z19 и pSAT4-TEF-AhA1.

Полученные конструкции были проверены на отсутствие мутаций секвенированием ДНК, как описано ранее [64] в Инструментальном центре биотехнологии и Генной инженерии (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) с использованием генетического анализатора ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City CA, США).

Сконструированные кассеты экспрессии pSAT1-TEF-Z19, pSAT4-TEF-AhA1 и pSAT6-TrpC-hph-EGFP были дополнительно вырезаны как AscI и I-SceI, PI-PspI и I -CeuI, соответственно, и субклонированы в те же сайты бинарного вектора pPZP-RCS2 [63]. Конечная конструкция pPZP-RCS2-TEF:Z19-TEF:AhA1-35S:EGFP-TrpC:hph, была использована для трансформации клеток *Th. thermophila* посредством электропорации.

2.6.1 Способ получения рекомбинантного штамма *Th. thermophila*/ pPZP-RCS2-TEF:Z19-TEF:AhA1-35S:EGFP-TrpC:hph

Рекомбинантный штамм-продуцент *Th. thermophila*/ pPZP-RCS2-TEF:Z19-TEF:AhA1-35S:EGFP-TrpC:hph получали путем электропорации клеток штамма *Th. thermophila* F-859 рекомбинантным бинарным вектором pPZP-RCS2-TEF:Z19-TEF:AhA1-35S:EGFP-TrpC:hph.

Конидии собирали с поверхности мицелия 15-дневной культуры гриба *Th. thermophila* F-859, выращенного на обедненной агаризованной среде Вогеля с добавлением 2% сахарозы путем их суспендирования стерильной водой с 2%-ным твином-80. Далее конидии переводили в буфер, содержащий 1 мМ HEPES, pH 7,0, 50 мМ маннитол, 0,01% TWEEN-20, и доводили до концентрации 10⁶/мл с использованием камеры Горяева. Далее суспензию конидий смешивали с 10 мкг плазмидной ДНК в объеме 250 мкл и помещали в ячейку для электропорации с зазором 0,2 см (Bio-Rad). Процедуру электропорации проводили в кюветном

электропораторе Gene Pulser Xcell (BioRad) в следующем режиме: два импульса по 1 мс каждый при 1,70 кВ с интервалом 5 с.

2.6.2 Способ получения рекомбинантных белков

Мицелий рекомбинантного штамма *Th. thermophila*/pPZP-RCS2-TEF:Z19-TEF:AhA1-35S:EGFP-TrpC:hph - продуцента запасных белков Z19 и AhA1, культивировали в жидкой питательной среде на основе картофельно-глюкозном бульоне или 25-% смеси рисовой муки и воды в течение 7 дней при 45°C, затем биомассу осаждали центрифугированием, суспензию дезинтегрировали в буфере (7 М мочевины, 2 М тиомочевины, 4% CHAPS) с использованием ультразвукового гомогенизатора Sonopuls. Гомогенизированный образец центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин при 4°C, супернатант переносили в новую пробирку. Общую концентрацию белка в клетках определяли с использованием реагента RC DC Protein Assay (Bio-Rad) в соответствии с протоколом производителя, альбумин бычьей сыворотки (BSA) использовали в качестве стандарта. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) проводили с использованием 12% полиакриламидного разделяющего геля и 4% концентрирующего геля в электрофорезной камере Mini-Protean III (Bio-Rad). Гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue G-250. Окрашенные белковые пятна, выбранные на основе их предсказанной молекулярной массы (MW), вырезали и подвергали трипсинолизу (Trypsin V511, Promega, Madison, WI, USA). Для идентификации MALDI-TOF 0,5 мкл образца (50%-ный раствор ацетонитрила в воде, 0,1% TFA) помещали на мишень из нержавеющей стали MALDI и 0,5-1 мкл матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты). Все масс-спектры были получены с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF фирмы Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) с азотным лазером, работающим в режиме позитивного отражателя под управлением программного обеспечения FlexControl (версия 3.4, Bruker Daltonics). Анализ проводился в автоматическом режиме (AutoXecute - автоматический запуск), как описано [35].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Скрининг штаммов мицелиальных грибов на антибиотикорезистентность

Способность синтезировать внеклеточные ферменты, разрушающие широкий спектр полимерных субстратов растений и водорослей, делает многие грибы актуальными для биотехнологии.

Штаммы мезофильных грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* и *Trichoderma* имеют недостатки, такие как повышенная споруляция, быстрое осеменение патогенами питательной среды. Многие мезофильные грибы являются производителями сильных микотоксинов. Кроме того, активность ферментов таких штаммов в их оптимальном температурном диапазоне недостаточно высока, чтобы обеспечить интенсивный процесс гидролиза [52, 53]. Поэтому поиск перспективных производителей белков и ферментов проводился среди штаммов термофильных грибов, выделенных из компоста местных ферм южного побережья Приморского края. Молекулярная идентификация выделенных культур по таким генетическим маркерам как β -тубулин и ITS выявил характерные виды для термофильных почвенных грибов, такие как *Mycothermus thermophilus*, *Thermomyces thermophilus*, *Thermothelomyces thermophila*, *Thermomyces dupontii*, *Thermomyces lanuginosus* (Табл. 5). Впервые в данной работе был проведен скрининг активных продуцентов мицелиального белка и полисахарид-деградирующих ферментов и среди морских микромицетов. Перспективные белковые продуценты среди морских штаммов мицелиальных грибов были отнесены к видам *Trichoderma spp.*, *Beauveria felina* (ранее *Isaria felina*), *Pseudallescheria ellipsoidea* и другие. Все штаммы, источники их выделения и идентификационные номера нуклеотидных последовательностей генетических маркеров приведены в Таблице 5.

Таблица 5 – Список штаммов мицелиальных грибов, используемых в данном исследовании

Вид мицелиального гриба	Номер штамма	Источник	ID (GenBank accession no.)	
			ITS rDNA	b-tubulin gene
<i>Thermothelomyces thermophila</i>	F-859	Рубец жвачного животного	MG921219	MG921571
<i>Th. thermophila</i>	50	Навоз	MG921229	MG921581
<i>Th. thermophilus</i>	3	Навоз	MH127860	MH127856
<i>Th. thermophilus</i>	4	Навоз	MH127861	MH127857
<i>Th. dupontii</i>	52	Навоз	MG921228	MG921580
<i>Th. lanuginosus</i>	5	Навоз	MG921227	MG921579
<i>M. thermophilus</i>	6	Навоз	MG921220	MG921572
<i>M. thermophilus</i>	55	Навоз	MH127859	MH127855
<i>M. thermophilus</i>	60	Навоз	MG921221	MG921573
<i>Trichoderma</i> sp.	12	Японское море, морская трава <i>Zostera marina</i>	MG921223	MG921575
<i>Trichoderma</i> sp.	13	Японское море, морская трава <i>Zostera marina</i>	MG921224	MG921576

Окончание таблицы 5

<i>Trichoderma</i> sp.	14	Японское море, прибрежный грунт	MG921225	MG921577
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	20	Охотское море, грунт Сахалинского залива	MG921230	MG921582
<i>Pseudallescheria</i> sp.	21	Донные отложения Южно-Китайского моря	MG921231	MG921583
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	2	Донные отложения Южно-Китайского моря	MH127858	MH127854
<i>Sirastachys phyllophila</i>	23	Донные отложения Южно-Китайского моря	MG921233	MG921585
<i>Ochroconis mirabilis</i>	22	Донные отложения Южно-Китайского моря	MG921232	MG921584
<i>Cladosporium</i> sp.	11	Донные отложения Южно-Китайского моря	MG921222	MG921574
<i>Beauveria feline</i>	16	Донные отложения Южно-Китайского моря	MG921226	MG921578

Термофильные и морские штаммы мицелиальных грибов, показавшие высокий уровень прироста биомассы, отсутствия способности выделять микотоксины, и широкий спектр высокоактивных ферментов, разрушающих растительные и водорослевые субстраты, были испытаны на устойчивость к антибиотикам для их возможного использования в новой системе генетической трансформации. Разработка универсальных генетических инструментов необходима для будущего использования мицелиальных грибов в биотехнологии. На сегодняшний день уже известны способы трансформации перспективного для

промышленности штамма термофильного гриба *Thermothelomyces thermophila* C1 (*Th. thermophila*), ранее известного как *Myceliophthora thermophila* [46].

Была разработана высокоэффективная система трансформации и разрушения целевых генов для *M. thermophila* ATCC 42464 на основе бинарного вектора pPK2BarGFPD, передающегося микромицету с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* [46, 47]. Маркером трансформации послужил ген устойчивости к фунгициду фосфинотрицину. Концентрация фосфинотрицина 100 мкг/мл полностью ингибировала рост этого гриба для использования в качестве селективного маркера для трансформантов. Однако из литературных источников известно, что одним из наиболее часто используемых селективных маркеров для грибов является ген устойчивости к гигромицину (*hph*) [48]. Выбор генетического маркера является важным этапом для конструирования и анализа мутантных штаммов мицелиальных грибов.

Для выбора подходящих генетических маркеров, которые можно будет в дальнейшем использовать для трансформации наших отобранных почвенных и морских грибных изолятов, были протестированы антибиотики фунгицидного ряда, такие как фосфинотрицин и гигромицин, а также канамицин (Табл. 6), так как новая система генетической трансформации создавалась на основе плазмиды pSAT-MCS, разработанный для получения рекомбинантных растений, которая оснащена геном устойчивости к канамицину [63].

Антибиотикорезистентность мицелиальных грибов представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Антибиотикорезистентность мицелиальных грибов

Вид штамма	<i>Isaria felina</i>	<i>Sc. brevicaulis</i>	<i>Th. thermophila</i>	<i>M. thermophilus</i>			<i>Th. thermophilus</i>		
Источники	Морской грунт	Морской грунт	Рубец жвачного животного	навоз			навоз		
Номер штамма	34.3г.10	34.1г.4	F-859	55	60	73	52 (<i>Th. dupontii</i>)	3	4
Канамицин, µg/mL									
2000	-	+	+	-	-	-	+	+	+
1500	-	+	+	-	-	-	+	+	+
1000	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Гигромицин, µg/mL									
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	+	-	-	+	+	+
5	+	+	+	+	-	-	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фосфинотрицин, µg/mL									
200	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Как видно из Таблицы 6, изоляты *Beauveria felina* и *Mycothermus thermophilus* (*M. thermophilus*) 55, 60 и 6 проявляли чувствительность к канамицину при концентрациях выше 1000 мкг/мл. Использование такой высокой концентрации антибиотика в среде для культивирования может вызвать трудности для использования плазмиды pSAT-MCS. Это предельные значения рабочей концентрации канамицина, используемые в данной системе при трансформации растительных клеток [63]. Однако все изученные мицелиальные грибы показали высокую устойчивость и к фосфинотрицину, исключая использование данного вещества в качестве селективного маркера. Поэтому ген, кодирующий гигромицин В фосфотрансферазу (*hph*), был выбран как единственный подходящий маркер для использования в новой системе генетической трансформации. Гигромицин полностью ингибировал рост мицелия даже при концентрации 10 мкг/мл у большинства изолятов, и 25 мкг/мл - для изолятов *M. thermophilus* 55, *T. thermophilus* 3, 4 и *T. dupontii* 52.

3.2 Получение векторной конструкции и опосредуемая электропорацией трансформация

Для проверки пригодности растительных векторов на основе плазмиды серии pSAT для легкого переноса генов-мишеней, а также для экспрессии генов белков в мицелиальных грибах, мы сначала использовали плазмиду pSAT6-35S-hph, содержащую тандемный промотор 35S мозаичного вируса цветной капусты (CaMV), лидер вируса табачной мозаики (TEV) и терминатор CaMV 35S. Нуклеотидную последовательность гена *hph*, кодирующего фермент для разрушения гигромицина (гигромицин В фосфотрансферазу), субклонировали как фрагмент XhoI-XbaI в тот же сайт кольцевой плазмиды вместо гена устойчивости к канамицину, в результате чего была получена конструкция pSAT6-35S-hph, представленная на рисунке 6.

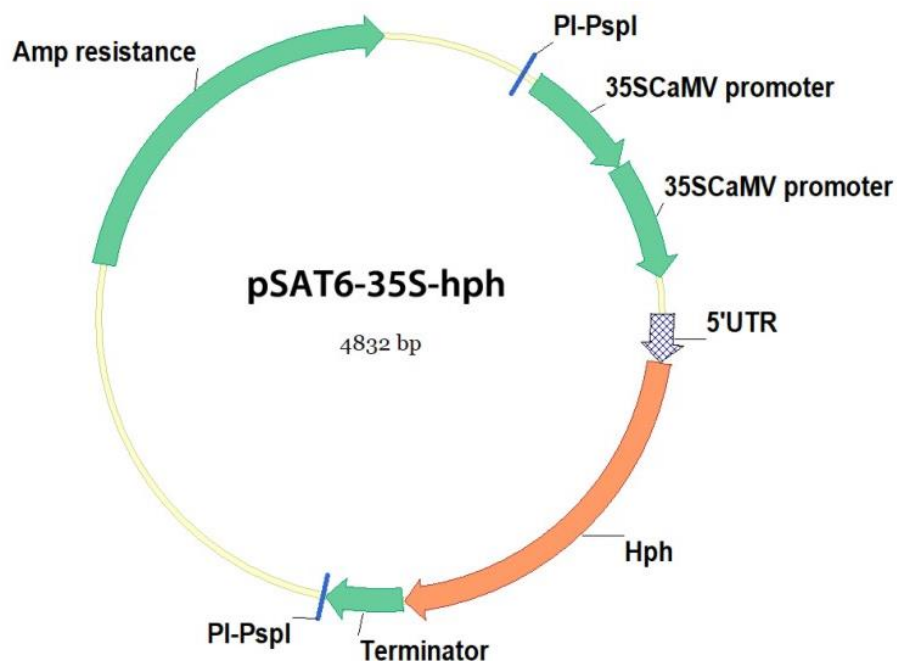


Рисунок 6 - Конструкция pSAT6-35S-hph

Поскольку мицелий грибов может быть дикариотиком, образованным путем слияния гифов, более эффективно использовать для трансформации одноклеточные конидии, дающие генетически однородные колонии [48]. Конидии - споры бесполого размножения многих грибов, в виде одноклеточных образований, или образующиеся в виде цепочек на ветвях (конидиеносцы) мицелия, который представляет собой вегетативное тело грибов, состоящее из одноклеточных или многоклеточных нитей [68].

Однако изученные здесь штаммы грибов продемонстрировали различную способность образовывать конидии, способные к трансформации внеклеточной ДНК, в зависимости от условий роста. За исключением штаммов *Th. thermophila*, другие термофильные штаммы и морские изоляты формировали стерильный мицелий на обедненной среде Вогеля (ММ), или давали конидии, которые по каким-либо причинам были неприменимы для метода электропорации. Например, штамм *M. thermophilus* 6 (73) продуцировал темно-коричневые конидии с очень толстыми стенками, которые визуализировались даже при небольшом увеличении микроскопа, это можно увидеть на рисунке 7.



Рисунок 7 - Мицелий 7-дневного штамма *M. thermophilus* 6 (73) с образовавшимися конидиями темно-коричневого цвета

Вероятно, слишком толстые стенки конидий были устойчивы к кратковременному воздействию электрического разряда и не образовывали поры. Поэтому на селективной среде с антибиотиком мы не могли наблюдать рост колоний. Однако штаммы *T. thermophilus* 3, 4, 5 и *Thermomyces dupontii* 52, выращенные на чашках с картофельно-глюкозным агаром (PDA), формировали трансформируемые конидии с эффективностью трансформации 38 ± 3 (для *T. thermophilus* 4 и 70 ± 5) трансформантов на чашку. Морские штаммы мицелиальных грибов росли до созревания трансформируемых конидий в течение большего периода времени (15 дней) при комнатной температуре. Результаты опосредованной электропорацией трансформации конидий с использованием разных буферов для электропорации были примерно одинаковыми. Однако разные импульсы тока ощутимо сказывались на результаты трансформации. Более высокая эффективность трансформации была получена при применении электрического импульса 8,5 кВ/см, подаваемого на буферную смесь, содержащую 10 мкг плазмидной ДНК и 1×10^5 конидий. Единичные колонии, выросшие на

селективной среде, содержащей 12,5 мг/мл гигромицина, были дополнительно проверены на присутствие трансформации геном *hph* с помощью ПЦР. Результаты ПЦР представлены на рисунке 8.

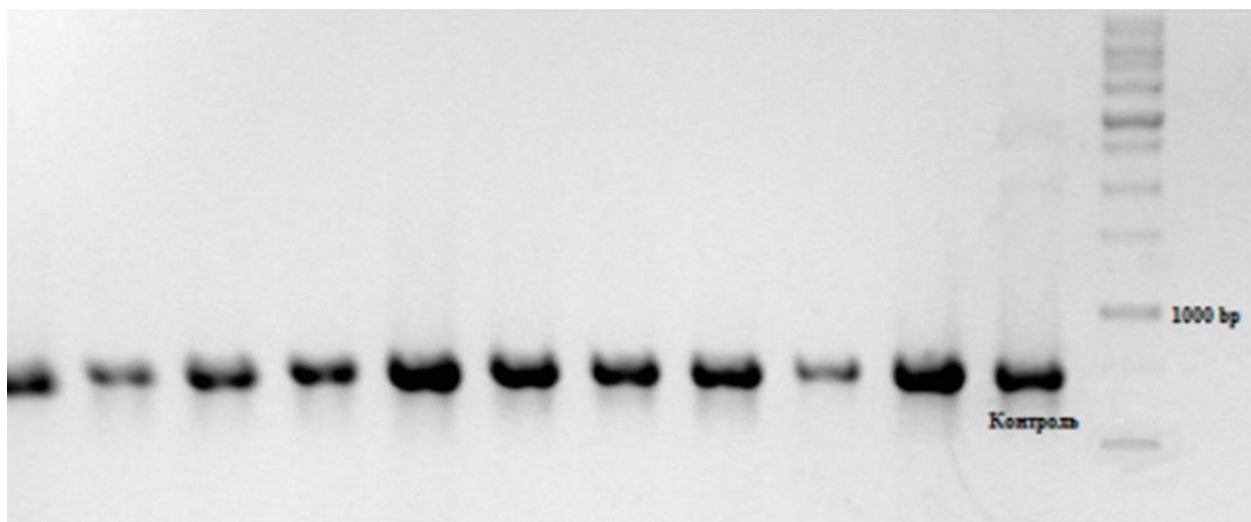


Рисунок 8 - ПЦР-продукты, полученные с использованием геноспецифических праймеров для последовательности гена *hgh* и геномной ДНК колоний *Th. thermophila*, выросших на селективной среде. Контрольным являлся ПЦР-продукт, полученный с использованием тех же праймеров и плазмидой pSAT6-35S-*hph*. Крайняя правая дорожка содержит маркер длины ДНК (Евроген).

3.3 Скрининг эффективности промоторов в мицелиальных грибах

Для тестирования новой системы генетической трансформации на основе плазмиды pSAT6-MCS и грибных промоторов, заимствованных из плазмиды pPK2BarGFPD, был выбран термофильный гриб *Th. thermophila* F-859 (*M. thermophila* F-859), депонированный в известной коллекции микроорганизмов [84], как модельный гриб из-за его способности образовывать тонкостенные прозрачные конидии на обедненной среде MM после 7-дневной инкубации (Рис. 9)



Рисунок 9 - Мицелий 7-дневного штамма *Th. thermophila* F-859 с образовавшимися конидиями светлого цвета

Плазмиду pPK2BarGFPD эффективно использовали для получения специфичного гена в *M. thermophila* и для изучения гена монооксигеназы цитохрома P450 из энтомопатогенного гриба *Metarhizium robertsii* [46, 89]. Поэтому было предположено, что специфические для грибов промоторы, такие как промотор фактора удлинения трансляции (TEF) из мезофильного мицелиального гриба *Aspergillus pullulans* и промотора триптофан-синтазы (*trpC*) из *Aspergillus nidulans*, закодированные в плазмиде pPK2BarGFPD, будут более эффективно работать в мицелиальных грибах, чем промотор вируса CaMV 35S, предназначенный для регуляции трансляции белков в растениях. Поэтому при конструировании векторов экспрессии на основе плазмиды pSAT6-MCS [63], содержащую тандем промотора мозаики цветной капусты CaMV 35S, лидер вируса табачной мозаики (TEV) и терминатор CaMV 35S, вырезали фрагмент по сайтам рестрикции AgeI-NcoI, содержащий тандем промотора CaMV 35S, и замещали его

тем же фрагментом AgeI-NcoI, содержащим промотор TrpC в одном случае, либо промотор TEF во втором варианте, в результате чего получили две рекомбинантные конструкции pSAT6-TrpC-hph (Рис. 10) и pSAT6-TEF-hph (Рис. 11), соответственно.

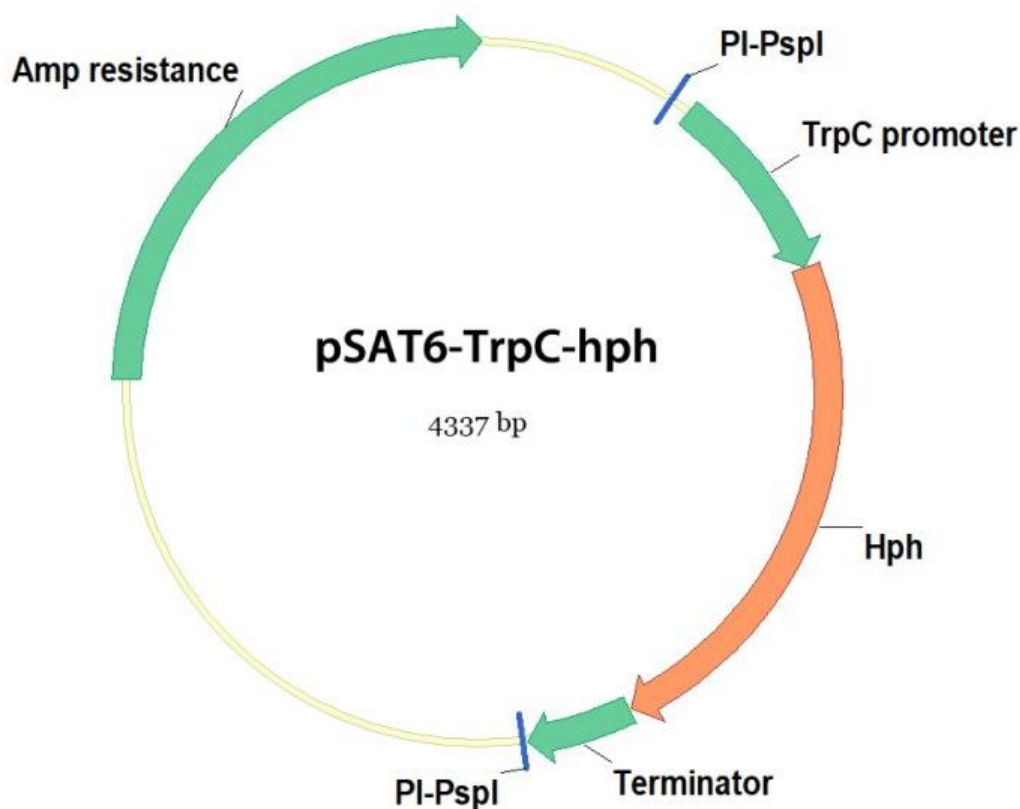


Рисунок 10 - Конструкция pSAT6-TrpC-hph, полученная на основе растительной плазмиды pSAT6- MCS

В плазмиде также присутствует ген, отвечающий за устойчивость к ампициллину, для их размножения и селекции с помощью клеток *E.coli*, и сайты рестриктаз PI-PspI для возможности замены области с генетическим маркером трансформации и регуляторными элементами, специфическими для мицелиальных грибов.

На следующем рисунке представлена конструкция pSAT6-TEF-hph.

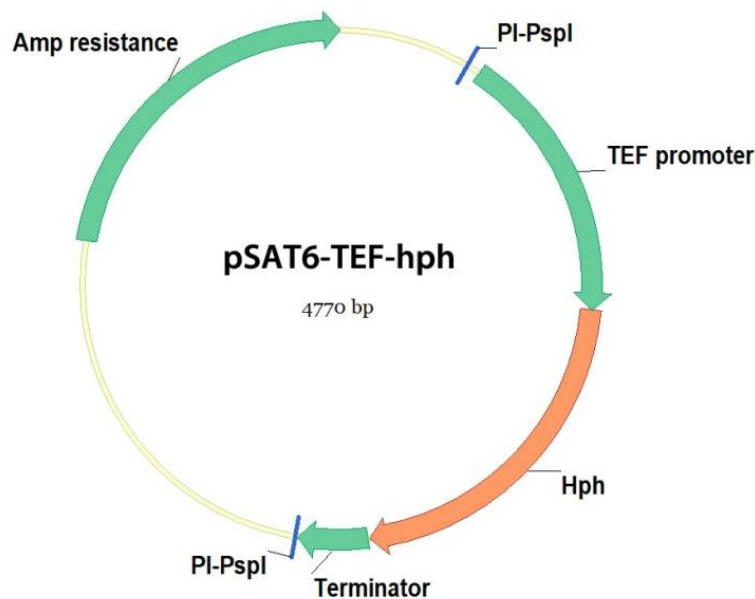


Рисунок 11 - Конструкция pSAT6-TEF-hph, полученная на основе растительной плазмиды pSAT6- MCS

3.4 Молекулярно-генетический анализ трансформантов

Чтобы подтвердить, что чужеродная ДНК была интегрирована в геном *Th. thermophila*, несколько предполагаемых резистентных к гиромоцину трансформантов были случайно выбраны для ПЦР-анализа с использованием геноспецифических праймеров Hgh D/R для гена *hph* (Рис. 8).

На рисунке 8 справа показан маркер длины фрагментов ДНК от 250 до 1000 пар нуклеотидов, дорожки 1-10 содержат ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК трансформированных колоний, выросших на селективной среде с гиромоцином. Длина полученных ПЦР-фрагментов соответствует длине ПЦР-продукта, полученного с использованием ДНК плазмиды pSAT6-TEF-hph, содержащей ген устойчивости к гиромоцину (*hph*), что являлось подтверждением прошедшего трансформационного события в клетках колонии грибов

ПЦР-анализ колоний, у которых синтез рекомбинантного белка, вызывающего устойчивость к гиромоцину, проходил под контролем промотора TrpC, показал приблизительно двукратное увеличение количества колоний, резистентных к гиромоцину, с эффективностью 140 ± 11 трансформантов на 10^5

конидий по сравнению с 61 ± 5 и 77 ± 7 трансформантов, полученных из тех же грибов с использованием промоторов CaMV 35S и TEF соответственно.

Таким образом было доказано, что использование промоторов TrpC и TEF, заимствованных у грибов, более целесообразно при трансформации мицелиальных грибов и получении в них рекомбинантных белков, чем использование растительного промотора.

3.5 Построение экспрессионной конструкции с рекомбинантными белками

Получение микробиологическим синтезом рекомбинантного запасного белка из семян зерновых культур может быть использовано в животноводстве для обогащения грибного мицелия и кормов сбалансированным по аминокислотному составу белком.

Однако из всех белков амарантовых стоит выделить проламиноподобный запасный белок A1 из *Amaranthus hypochondriacus L.*, который содержит в своем составе наибольшее количество дефицитных в кормопроизводстве аминокислот:

- 8,36% лизина;
- 6,13% треонина;
- 2,99% метионина;
- 6,37% валина;
- 4,09% триптофана.

Такое количество дефицитных аминокислот превышает в несколько раз содержание их в таких белках, как казеин, овальбумин, лактальбумин, белок сои и пр. Поэтому аминокислотная последовательность проламиноподобного запасного белка амаранта A1, созданная природой, является лучшей альтернативой для целей получения наиболее сбалансированного по аминокислотному составу протеина рекомбинантным способом [49, 50].

Таким образом, разработка векторной системы, позволяющей переносить и экспрессировать в клетке термофильного мицелиального гриба гетерологичный

растительный белок для получения рекомбинантных штаммов мицелиальных грибов с комбинированными свойствами представляется актуальной.

В данной работе был сконструирован рекомбинантный штамма-продуцент *Th. thermophila* F-859, несущий экспрессирующую конструкцию (плазмиду), которая позволит получать рекомбинантные кормовые белок семян амаранта *Amaranthus hypochondriacus* A1 и зеин Z19 глютена кукурузы *Zea mays*, которые можно будет использовать для балансирования аминокислотного состава кормового белка.

Экспрессионная конструкция плазмидной ДНК pSAT1-Z19, кодирующая рекомбинантный белок кукурузного глютена Z19, представлена на рисунке 12.

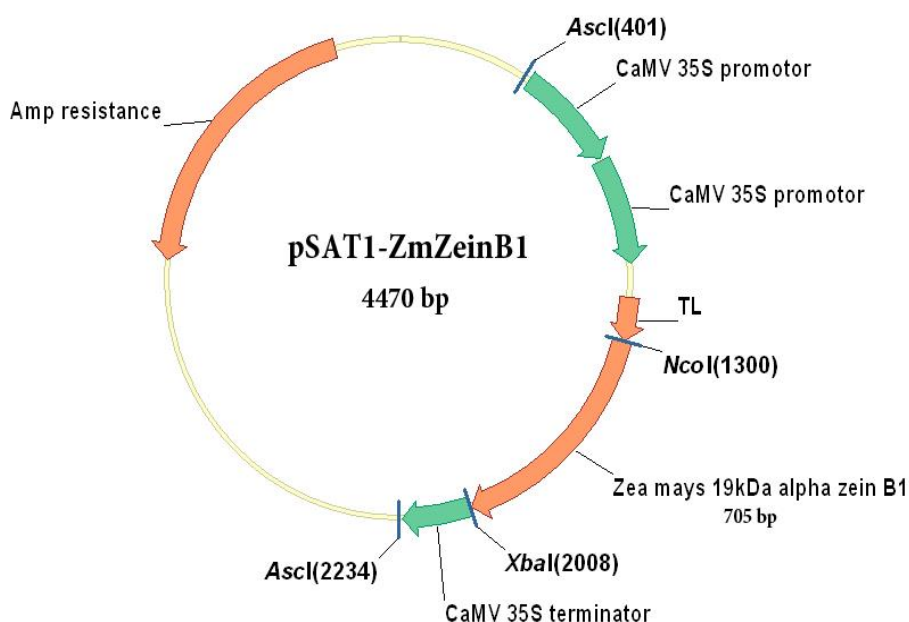


Рисунок 12 - Экспрессионная конструкция рекомбинантной плазмидной ДНК pSAT1-Z19

Плазмида pSAT1-Z19 имеет 4470 пар оснований и характеризуется наличием NcoI/XbaI-фрагмента плазмиды pSAT1-MCS, последовательностью фрагмента ДНК размером 705 п.о., содержащего кодирующий участок гена зрелого белка кукурузы с молекулярной массой 19 кДа (со стартовым кодоном).

Экспрессионная конструкция рекомбинантной плазмидной ДНК pSAT1-AhA1, кодирующая рекомбинантный белок семян амаранта AhA1, представлена на рисунке 13.

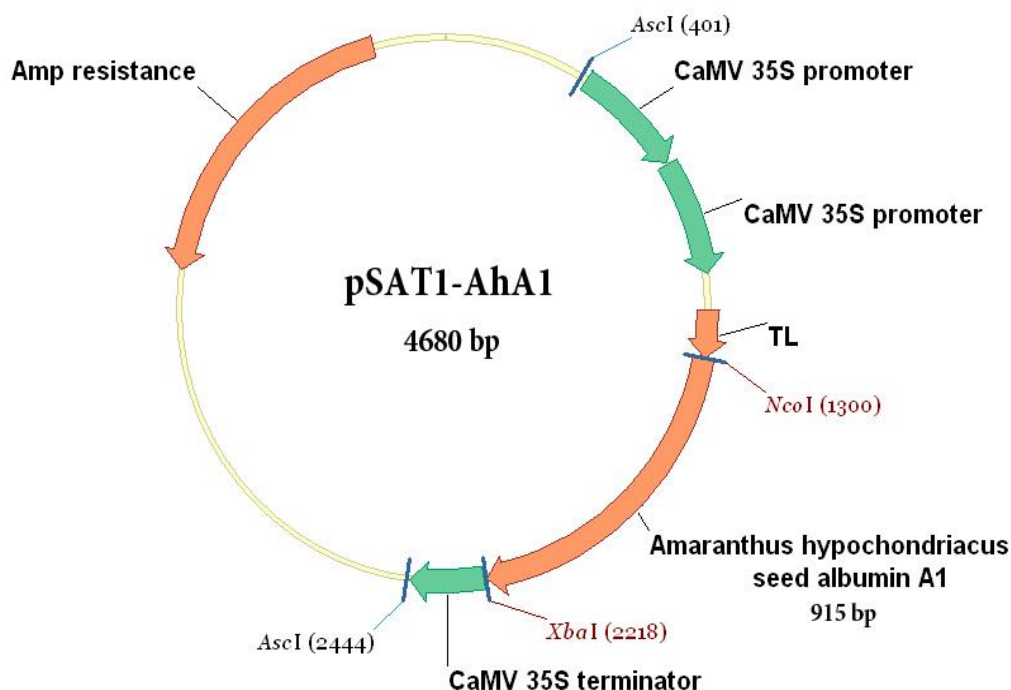


Рисунок 13 - Экспрессионная конструкция рекомбинантной плазмидной ДНК pSAT1- AhA1

Плазмида pSAT1-AhA1 имеет 4680 пар оснований (п.о.) и характеризуется наличием NcoI/XbaI-фрагмента плазмиды pSAT1-MCS [63] и последовательности фрагмента ДНК размером 915 п.о., содержащего кодирующий участок гена зрелого белка семян амаранта AhA1 (со стартовым кодоном).

3.6 Построение бинарного вектора для генетической трансформации *Th. Thermophila*

Для возможности одновременного синтеза нескольких рекомбинантных белков в одном штамме полученные рекомбинантные экспрессионные плазмиды были субклонированы в один бинарный вектор. Участок нуклеотидной последовательности с новыми генами, кодирующими промотор и гиромицин фосфотрансферазу TrpC-hph, был вырезан из полученной плазмиды pSAT6-TrpC-

hph как фрагмент сайтов рестрикции PI-PspI (Рис. 10), и субклонирован в бинарный вектор pPZP-RCS2-EGFP, содержащий левую и правую фланкирующие области Ti-плазмиды [60]. Чтобы определить функциональность этой плазмиды, в вектор был также клонирован ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (EGFP), под контролем tandemных промоторов CaMV 35S и терминаторной последовательностей [60]. Окончательная конструкция бинарного вектора pPZP-RCS2-EGFP-*hph*, представленная на рисунке 14, использовалась для одновременной доставки этих двух генов в клетки *Th. thermophila* посредством электропорации.

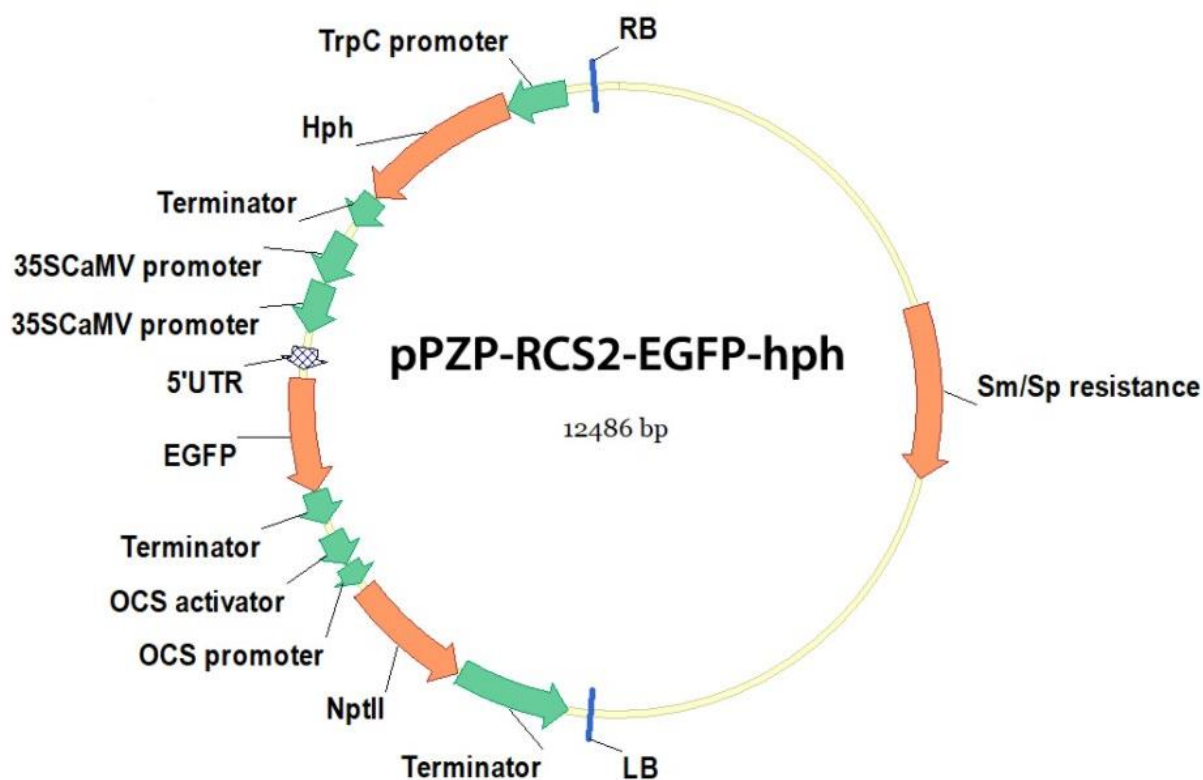


Рисунок 14 – Бинарный вектор pPZP-RCS2-EGFP-*hph*, несущий ген *hph* под контролем промотора триптофан-синтазы *trpC* *Aspergillus nidulans* и зеленый флуоресцентный белок (EGFP) под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты CaMV 35S; BR и BL – правая и левая границы соответственно

Результаты микроскопии с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 LIVE показали высокий уровень сигнала

зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в 7-дневном мицелии рекомбинантного штамма *Th. thermophila*, модифицированного бинарным вектором pPZP-RCS2-EGFP-hph. Данные результаты представлены на рисунке 15.

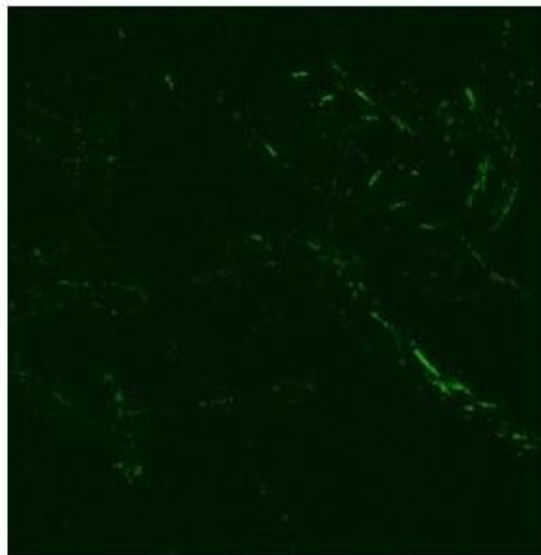


Рисунок 15 – Определение сигнала зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в 7-дневном мицелии рекомбинантного штамма *Th. thermophila*, модифицированного бинарным вектором pPZP-RCS2-EGFP-hph

Таким образом, тестирование бифункционального вектора показало возможность использования конструкций на его основе для получения ценных рекомбинантных протеинов в мицелиальных грибах.

На основе бинарного вектора pPZP-RCS2-EGFP-hph получили конструкцию pPZP-RCS2-TEF: Z19-TEF: AhA1-35S: EGFP-TrpC: hph, содержащую плазмиды pSAT1-Z19 и pSAT4-AhA1 в виде кассет экспрессии для получения рекомбинантных белков глютена кукурузы Z19, глобулина семян амаранта A1, а также белка В-резистентности гигромицина, каждый из которых контролировался своим промотором. Результат экспрессии гетерологичных белков в рекомбинантных колониях штамма *Th. thermophila*/pPZP-RCS2-TEF: Z19-TEF: A1-35S: EGFP-TrpC: hph подтвердили его эффективную модификацию. Результаты представлены на рисунке 16.

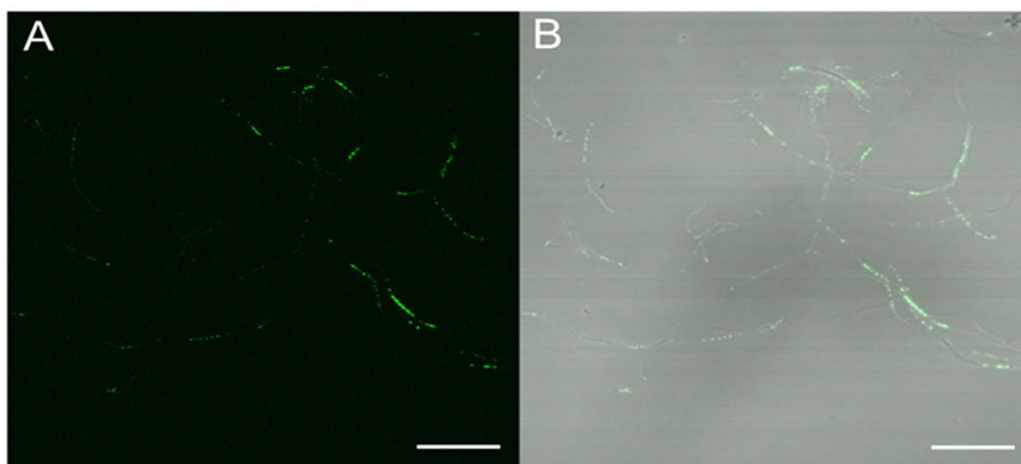


Рисунок 16 – Конфокальная флуоресцентная визуализация штамма *Th. thermophila*, трансформированного рекомбинантным бинарным вектором pPZP-RCS2-TEF: Z19-TEF: A1-35S: EGFP-TrpC: hph (А – излучение флуоресцентного белка EGFP, В – изображение флуоресценции EGFP с ярким полем, полоса 50 мкм)

После пяти пассажей субкультур трансформированного штамма *Th. Thermophila*/pPZP-RCS2-TEF: Z19-TEF: A1-35S: EGFP-TrpC: hph при отсутствии гигромицина все случайно выбранные колонии выросли на чашках с PDA, содержащего концентрацию антибиотика – 12,5 мкг/мл, что подтвердило генетическую стабильность интегрированных генов.

3.7 Характеристика рекомбинантного штамма

Рекомбинантный штамм *Th. thermophila*/pPZP-RCS2-TEF: Z19-TEF: A1-35S: EGFP-TrpC: hph характеризуется следующими признаками:

1) культурально-морфологические признаки: колонии на агаризованном солодовом экстракте быстро растущие, достигающие 60-65 мм в диаметре через 7 дней, распростертые, сначала белые, затем светло-коричневые, текстура поверхности гранулированная. Вегетативные гифы септированные, неокрашенные. Конидиеносцы простые или разветвленные, бесцветные. Конидии образуются одиночно или небольшими группами, неокрашенные, гладкие, овальные до грушевидных, 4-10(12)х3-5 мкм. Пигмент отсутствует. Штамм хорошо растет на

таких средах, как агаризованный солодовый экстракт (мальт-пептонный агар: мальт-экстракт - 30 г, пептон – 1 г, агар-агар – 15 г), картофельно-глюкозный агар (картофельный отвар – 200 г, глюкоза – 20 г, агар-агар – 15 г), а также на жидкой среде, содержащей воду и мучку рисовую 25%, при температуре 45°C. Дополнительно, штамм *Th. thermophila*/pPZP-RCS2-TEF: Z19-TEF: A1-35S: EGFP-TrpC: hrh хорошо растет на твердофазной среде при влажности 60%, содержащей растительные субстраты: рисовая шелуха (5%), мучка рисовая (65%), соевый шрот (30%) при температуре 45°C.

2) физико-биологические признаки: штамм характеризуется высокой гемицеллюлозолитической активностью, устойчивостью к гигромицину (12,5 мкг/мл), штамм хранится обычным способом в суспензии с глицерином (30%) при -70°C, а также не патогенен и не токсичен для теплокровных животных.

На сегодняшний день известны способы обогащения белком амаранта *Amaranthus hypochondriacus* (AmA1) плодов трансгенных растений томатов, кукурузы или табака путем внедрения в растения гена, кодирующего белок AmA1 [31]. Однако, получение мутантных сортов кукурузы (мутации *opaque-2* (*o2*) и *floury-2* (*fl2*)), обогащенных дефицитными для растительных белков аминокислотами лизином и триптофаном методами генной инженерии и селекции, приводили к получению растений, дающих мягкие и быстро портящиеся зерна [56, 65]. Получение рекомбинантных зеинов и белка амаранта A1 методом гетерологической экспрессии в микробиальных штаммах-продуцентах в литературных источниках не освещено.

Использованием термофильного мицелиального гриба *Th. thermophila*, модифицированного рекомбинантным бинарным вектором, кодирующим кормовые белки кукурузы и амаранта может быть в дальнейшем использовано для разработки способов получения кормов из растительных субстратов и обогащения кормов сбалансированным по аминокислотному составу белком.

Заключение

Мы предложили простой и высокоэффективный метод трансформации, опосредуемый электропорацией, для мицелиальных грибов. Результаты, полученные с помощью *Th. thermophila* F-859 в качестве хозяина для экспрессии рекомбинантных белков, подтвердил эффективность новой разработанной системы генетической трансформации pPZP-RCS2-EGFP-hph для замены у мицелиальных грибов собственных белков или гетерологической экспрессии в них рекомбинантных белков в случае необходимости увеличения продуктивности штаммов или эффективности конверсии растительных субстратов. В результате проделанной работы были разработаны новые перспективные штаммы в качестве реципиентов рекомбинантных генетических конструкций, такие как почвенные термофилы *Thermomyces thermophilus*, *Mycothermus thermophilus*, *Thermothelomyces thermophila* и морские грибы *Isaria felina* и *Scopulariopsis brevicaulis*, способные разрушать широкий спектр полисахаридов растений и водорослей.

Бинарный вектор pPZP-RCS2-EGFP-hph может стать основой для создания новых штаммов-продуцентов ценных протеинов биотехнологического назначения. Все идентифицированные активные гемицеллюлозолитические штаммы термофильных наземных и морских грибов представляют интерес для использования их полисахарид-деградирующего потенциала как при конверсии различных растительных отходов сельского хозяйства и марикультуры, так и для обогащения животноводческих кормов ферментами и сбалансированными протеинами.

В ходе проделанной работы была разработана универсальная технология получения ценных протеинов в мицелиальных грибах с помощью методов метаболической инженерии, для этого были выполнены следующие задачи:

- 1) найден оптимальный маркер трансформации для термофильных и морских штаммов мицелиальных грибов,
- 2) получена генетическая конструкция на основе растительной плазмиды pSAT с оптимальным для исследованных микромицетов маркером трансформации – гигромицином (*hph*)

- 3) выполнена оптимизация промоторов для синтеза рекомбинантных белков в мицелиальных грибах,
- 4) выполнена оптимизация условий трансформации мицелиальных грибов,
- 5) получен бинарный вектор для синтеза запасных белков семян кукурузы и амаранта, и целлюлозолитических ферментов.

Результаты работы опубликованы в научных сборниках:

1 А. А. Ларионова Особенности селекции и культивирования кукурузы, применение ГМО и анализ рынка. // Новая экономика, бизнес и общество: сборник материалов апрельской научно-практической конференции молодых ученых ШЭМ (г. Владивосток, 28 апреля 2017 г.). – С. 896-900.

2 Базюх П. К., Ларионова А. А., Слепченко Л. В., Шкрыль Ю. Н., Югай Ю. А., Балабанова Л. А. Разработка векторной системы для эффективной генетической трансформации мицелиальных грибов как перспективных продуцентов белков // Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений. Сборник статей VII Международной научно-технической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора Зубченко А. В. (Воронеж, 13-15 июня 2018 года). – С. 317-321.

Список используемых источников

1. Пат. 2005789 Российская Федерация, МПК С 12 Р 1/00 А, С 02 F 3/34 В. Способ очистки животноводческих стоков и получение биомассы / М. В. Левчикова, Р. А. Мельник, Л. И. Ульченко, А. А. Ковалев ; заявитель и патентообладатель «Всероссийский институт электрофикации сельского хозяйства». - № 4856861/13 ; заявл. 26.06.1990 ; 15.01.1994, Бюл. № 1. – 6 с.
2. Пат 2354135 Российская Федерация, МПК А 23 К 1/14, С 05 F 11/00; С 12 N 1/12. Способ переработки отходов растительного сырья / Редикульцев Ю. В., Кудряшов В. К, Шкидченко А.Н.; Патентообладатель - Ин-т биол. приборостроения с опытным производством РАН и авторы. - Заявка N 2007118529/13, от 18.05.2007; Оpubл. 10.05.2009. Дата публикации: 10.02.2016.
3. Пат. 2354633 Российская федерация, МПК С 05 F 11/08, С 02 F 3/34 . Способ утилизации жиросодержащих отходов и продукт, получаемый этим способом / Н. С. Фунтикова, Н. Б. Сократова, М. С. Тришкин ; заявители и Н. С. Фунтикова, Н. Б. Сократова, М. С. Тришкин. – № 2007124272/13 ; заявл. 28.06.2007 ; 10.05.2009, Бюл. № 13. – 6 с.
4. Абрамов З. Н. Введение в генную инженерию: – учеб .пособие / З. Н. Абрамов. – Казань :Казанский государственный ун-т, 2008 – 169 с.
5. Базунова, М. В. Способы утилизации отходов полимеров / М. В. Базунова, Ю. А. Прочухан // Вестник башкирского университета. – 2008. – Т. 13, № 4. – С. 875- 885.
6. Билай, Т. И. Термофильные грибы и их ферментативные свойства. Киев: Наукова думка, 1985.- 172 с.
7. Великов, В. А. Молекулярная биология : учеб. Пособие / В. А. Великов. - Саратов: Саратовский источник, 2013. - 84 с.
8. Гвоздева Е. С. Практикум по генетической инженерии и молекулярной биологии растений: учеб. пособие / Е. С. Гвоздева. – Томск : Томский государственный университет, 2012. – 96 с.

9. Гнеушева, И. А. Биотехнологические подходы для получения белково-углеводных кормовых добавок для животноводства / И. А. Гнеушева, И. В. Горькова. – Воронеж, - 2014.

10. Голязимова, О. В. Увеличение эффективности измельчения лигноцеллюлозного растительного сырья с помощью химической обработки / О. В. Голязимова, А. А. Политов, О. И. Ломовский // Химия растительного сырья. – 2009. - № 2. – С. 53-58.

11. Дедков, В. Н. Биоконверсия соломы злаковых культур грибами рода *Trichoderma* в кормовые продукты для животноводства / В. Н. Дедков, И. А. Гнеушева, Н. Е. Павловская // Вестник Орел ГАУ. – 2012. – №4(37). – С. 102-105.

12. Дедков, В. Н. Развитие инновационного потенциала агропромышленного производства // Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2010. – С. 45-48.

13. Егоров, Н. С. Проблемы и перспективы : учеб. пособие / Н. С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1987. – 159 с.

14. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. – 4-е изд., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 208 с.

15. Журавель, Н. В. Амарант - перспективная зернокормовая культура для возделывания на юге России / Н. В. Журавель, В. В. Чумакова // Зерновое хозяйство России. – 2012. - № 2. – С. 18- 25.

16. Красильников, О. Ю. Возможности альтернативного кормопроизводства в России / О. Ю. Красильников // Птицеводческое хозяйство. Птицефабрика. – 2011. - № 7.

17. Ленинджер, А. Основы биохимии: В 3-х т. Т. 3. Пер. с англ.-М.: Мир, 1985.-320 с.

18. Магомедов, И. М. Физиологические особенности конкурентоспособности амаранта / И. М. Магомедов // Успехи современного естествознания. – 2008. - № 5. – С. 41-43.

19. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. / Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // М., Мир, 1984, 480 с.
20. Мхитарян, Г. А. Современные технологии переработки свекловичного жома / Г. А. Мхитарян, А. П. Леснов, В. М. Ткаченко // Сахарная свекла. – 2009. - № 2. – С. 33- 35.
21. Мхитарян, Г. А. Современные технологии переработки свекловичного жома / Г. А. Мхитарян, А. П. Леснов, В. М. Ткаченко // Сахарная свекла. – 2009. - № 2. – С. 33-35.
22. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных : справ. пособие / А. П. Калашников, В. И. Фисинин, В.В. Щеглов. – 3-е издание переработанное и дополненное. – М. : Изд-во ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии, 2003. – 456.
23. Нуртдинов, Р. М. Высокотемпературный гидролиз растительного сырья // Р.М. Нуртдинов, С.Г. Мухачев, Р.Т. Валеева [и др.] // Вестник казанского технологического университета. – 2011. - № 10. – С. 204-208.
24. Нуртдинов, Р. М. Низкотемпературный гидролиз растительного сырья / Р. М. Нуртдинов, Р. Т. Валеева, С. Г. Мухачев // Вестник казанского технологического университета. – 2011. - № 15. – С. 150-153.
25. Панфилов, В. И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. – М., 2004 - 371 с.
26. Покровский, В. И. Внутрибольничные инфекции: проблемы и пути решения / В. И. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2000. - № 5. - С. 12-24.
27. Смирнов, К. А. Особенности твердофазной ферментации / К. А. Смирнов, Ю. Д. Алашкевич, Н. С. Решетова // Химия растительного сырья. – 2009. - № 3. – С. 161-164.
28. Хохрин, С. Н. Корма и кормление животных / С.Н. Хохрин. – Санкт-Петербург : Лань, 2003. – 512 с.

29. Чернов, И. А. Специфика биосинтеза высоколизинового белка у растений рода *Amaranthus* L., состав, свойства и технология его выделения из фитомассы амаранта / И. А. Чернов, Г. А. Гасимова, И. А. Дегтярёва, Ю. А. Куликов // Ученые записки казанского государственного университета. Естественные науки. – 2007. – Т. 149, кн. 4. – С. 8- 19.
30. Широкова, О. М. Методы генетической трансформации : учеб. пособие / О. М. Широкова. – Нижний Новгород : Изд-во Нижегородского госун-та, 2013. – 30 с.
31. Accession no: AF49129, Chakraborty et al., SEQ ID NO: 5. 2000 - U.S. patent 5846736. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97, Chakraborty, S., Chakraborty, N., and Datta, A. P. 3724-3729.
32. Anneli Ritala. Threonine and lysine content is typically high // Fungi Products from *Saccharomyces*, *Fusarium*, and *Torulopsis* are commercially available. *Frontiers in Microbiology*. – 2017. –Vol.8.
33. Bonugli-Santos, R. C., dos Santos Vasconcelos, M. R., Passarini, M. R. Z., Vieira, G. A. L., Lopes, V. C. P., Mainardi, P. H., dos Santos, J. A., de Azevedo Duarte, L., Otero, I. V. R., da Silva Yoshida, A. M., et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. – 2015. *Front. Microbiol.* 6, P. 269. doi: 10.3389/fmicb.2015.00269.
34. Borines, M. G., de Leon, R. L., McHenry, M. P. Bioethanol production from farming non-food macroalgae in Pacific island nations: chemical constituents, bioethanol // *Renew. Sustainable Energy* 15, -2015, P. 4432–4435. doi: 10.1016/j.rser.2011.07.109.
35. Boston R.S. The Genetics and Biochemistry of Maize Zein Storage Proteins / J. L. Bennetzen and S. Hake (eds.), *Maize Handbook - Volume II: Genetics and Genomics*, 715. Springer Science, Business Media LLC 2009.
36. Bredford, M.M. // *Anal Biochem.*- 1976. - Vol. 72. №.1–2. – P. 248–254.

37. C. Sarnklong, J. W. Cone, W. Pellikaan and W. H. Hendriks Utilization of Rice Straw and Different Treatments to Improve Its Feed Value for Ruminants: A Review Asian-Aust. J. Anim. Sci. – 2010. - Vol. 23, P. 680 – 692.

38. Chadd, S. A. Practical production of protein for food animals / S. A. Chadd, W. P. Davies, J. M. Koivisto // Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002-2004. - № 1. – P. 77-125.

39. Chadd, S.A. Practical production of protein for food animals / S.A. Chadd, W.P. Davies, J.M. Koivisto // Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok. – 2002-2004. - № 1. – P. 77-125.

40. Coleman, C. E. The prolamins of maize. in seed proteins / P. R. Shewry and R. Casey. - 1998. - P. 109–139.

41. Dashtban Mehdi, Fungal bioconversion of lignocellulosic residues. Opportunities and perspectives / Dashtban Mehdi // International Journal of Biological Sciences. – 2009. – P. 578–595.

42. Davis et al. Methods in Enzymology / Davis, Rowland, Neurospora // Contributions of a Model Organism, Oxford University Press. - 2000.

43. Deshmukh, S. K., Prakash, V., Ranjan, N. Marine Fungi: A source of potential anticancer compounds. Front. Microbiol. – 2015. -№8, doi: 10.3389/fmicb.2017.02536.

44. Edwards J.R. Meropenem: a microbiological overview // J. Antimicrob. Chemotherapy. - 1993. - № 36. - P. 1-17.

45. Hagen, G. Complex organization of zein genes in maize / Rubenstein, I. – 1981. - Gene 13, 239–249.

46. Jing Xu, Jingen Li, Development of genetic tools for Myceliophthora thermophila BMC Biotechnology // Thermotheleomyces thermophile, Mycologia. – 2015. Vol. 107. P. 630.

47. Jorge A. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects Bioresource Technology / ed. by Jorge A. Ferreira // 2012.

48. Kim, S. Current technologies and related issues for mushroom transformation / S. Kim // Mycobiology. – 2015. Vol. 43, P. 1–8.

49. Lio, J. Y. Solid-state fermentation of soybean and corn processing coproducts for potential feed improvement / J. Y. Lio // Journal of Agricultural and Food – 2012. – Vol. 60, P. 7702-7709.

50. Lowry O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent / N. J. Rosebrough, A. L. Farr // J. Biol. Chem.- 1951. - Vol. 193. №1. – P. 265-275.

51. McCormac A, Elliot M, Chen D. Фю: pBECK2000: a novel plasmid series for the facile creation of complex binary vectors, which incorporates «clean-gene» facilities / A. McCormac, M. Elliot // Molecular and General Genetics. – 1999. – Vol. 261, - P. 226–235.

52. Mehdi Dashtban, Heidi Schraft. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities and perspectives / Vijai G. Gupta, Monika Schmoll, Alfredo // Biotechnology and Biology of Trichoderma Newnes. – 2014. P. 650.

53. Nolwenn Hymery. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: a Review Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety // Food Safetyю - 2014. – P. 437-456.

54. Oliviert Martínez-Cruz. Biochemical Characteristics and Nutraceutical and Technological Uses of Amaranth Globulins Chapter // Production and Role in Immunity, Edition: 1, Chapter: 3, Publisher: Nova Science Publishers, Editors: Sheila D. Milford. – 2014. P.41-70.

55. Paula Monteiro de Souza, Mona Lisa de Assis Bittencourt. A biotechnology perspective of fungal proteases // Braz J Microbiol.- 2015. P. 337–346.

56. Prasanna B. V, Quality protein maize / S. K. Vasal, B. Kassahun // Current Science. – 2001. - 81: 1308-1319.

57. Qian Y, Zhong L, Hou Y. Characterization and Strain Improvement of a Hypercellulytic Variant, Trichoderma reesei SN1 // by Genetic Engineering for Optimized Cellulase Production in Biomass Conversion Improvement. Front. Microbiol. – 2016. Vol. 7:1349. doi: 10.3389/fmicb.2016.01349.

58. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning. A. Laboratory Manual. 2bd ed. Cold Spring Harbor, NY, 1989.

59. Shimoni Y. Recombinant Protein of Two High Molecular Weight Glutenins Alters Gluten Polymer Formation in Transgenic Wheat / A. E. Blechl , O. D. Anderson // J BIOL CHEM. – 1997. – Vol. 272, P. 15488–15495.

60. Shkryl, Y. N, Green synthesis of silver nanoparticles using transgenic *Nicotiana tabacum* callus culture expressing silicatein gene from marine sponge *Latrunculia* / ed. by G. N Veremeichik, D. G. Kamenev // Artif Cells Nanomed Biotechnol. – 2017. doi:10.1080/21691401.2017.1388248.

61. Sinil Kim, Byeong-Suk Ha and Hyeon-Su Ro Current Technologies and Related Issues for Mushroom Transformation Mycobiology. – 2015. – P. 1-8.

62. Sustainable improvement of livestock production through strategic supplementation with urea-molasses multi-nutrient block and other feed resources available in Pakistan / ed. by S.A. Khanum, M. Hussain. - Livestock experiment station, qadirabad, 2006. – P. 91-110.

63. Tzfira T, pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants / ed. by T. Tzfira, G. W. Tian // Plant Molecular Biology. – 2005. – Vol. 57, P.503–516.

64. Veremeichik, G. N. Expression profiles of calcium-dependent protein kinase genes (CDPK1-14) in *Agrobacterium rhizogenes* pRiA4-transformed calli of *Rubia cordifolia* under temperature- and salt-induced stresses / ed. by G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl, S. A. Pinkus // Plant Physiol. – 2015. – Vol. 171, P.467–474.

65. Wua Y. γ -Zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize / Holdingb D.R, Messinga J. – 2010. - PNAS 107: 12810–12815.

66. Yessie Widya Sari, Biomass and its potential for protein and amino acids: valorizing agricultural by-products. - Wageningen University, 2015. – 152.

67. Алексеев, Г. В. Переработка нетрадиционного растительного сырья с целью дальнейшего его использования в продуктах питания / Г. В. Алексеев, В. А. Головацкий, И. В. Краснов // Электронный научный журнал процессы и аппараты пищевых производств [Электронный ресурс] / СПб НИУ ИТМО ИХиБТ. – Электрон. текстовые дан. – С-Петербург : СПбГУНиПТ, 2007. – Режим доступа: <http://processes.open-mechanics.com/articles/29.pdf>.

68. Биология и медицина [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://medbiol.ru4>.
69. Биомолекула [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <https://biomolecula.ru>.
70. Биотехнология [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://www.biotechnolog.ru>.
71. Генетическая инженерия [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <https://otherreferats.allbest.ru>.
72. Евроген [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://evrogen.ru>.
73. Журнал «физиология растений» [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://www.rusplant.ru>.
74. Медицинская энциклопедия [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://www.medical-enc.ru>.
75. Молекулярное клонирование [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <https://elementy.ru>.
76. Основные типы клонирующих векторов [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://medbe.ru>.
77. Основы полимеразной цепной реакции [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://dna-technology.ru>.
78. Получение рекомбинантных белков OprL и OprI наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммунобиологических свойств [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://www.dissercat.com>.
79. Получение рекомбинантных энтеротоксинов *Staphylococcus aureus* в *Escherichia coli*. [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://www.dissercat.com>.
80. Справочник химика 21 [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://chem21>.
81. Сравнительное изучение эффективности *Agrobacterium*-опосредованной транзientной экспрессии гетерологичных генов, кодирующих рекомбинантные

белки [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://www.dissercat.com>.

82. Сравнительный анализ экспрессии гетерологичных генов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* и изучение условий повышения продукции рекомбинантных белков [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://www.dissercat.com>.

83. Эффективная медицина [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <https://www.medactiv.ru>.

84. All-Russian collection of microorganisms [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://www.vkm.ru>.

85. Altering wheat dough viscoelasticity with modified glutenins. [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <https://patents.google.com>.

86. Docplayer [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://docplayer.ru>.

87. Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2014 [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <https://doi.org>.

88. Genbank Acc. No. AF371269 [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

89. Lin L, Fang W, Liao X, Wang F. The MrCYP52 cytochrome P450 monooxygenase gene of *Metarhizium robertsii* is important for utilizing insect epicuticular hydrocarbons [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: <http://journals.plos.org>.

90. Modern use of feed raw Materials in poultry feeding agrofeed [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. - Режим доступа: www.agrofeed.ru.

Приложение А

Публикации в научных сборниках

1 А. А. Ларионова Особенности селекции и культивирования кукурузы, применение ГМО и анализ рынка. // Новая экономика, бизнес и общество: сборник материалов апрельской научно-практической конференции молодых ученых ШЭМ (г. Владивосток, 28 апреля 2017 г.). – С. 896-900.

2 Базюх П. К., Ларионова А. А., Слепченко Л. В., Шкрыль Ю. Н., Югай Ю. А., Балабанова Л. А. Разработка векторной системы для эффективной генетической трансформации мицелиальных грибов как перспективных продуцентов белков // Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений. Сборник статей VII Международной научно-технической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора Зубченко А. В. (Воронеж, 13-15 июня 2018 года). – С. 317-321.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Дальневосточный федеральный университет»

ШКОЛА ЭКОНОМИКИ И МЕНЕДЖМЕНТА

Кафедра товароведения и экспертизы товаров

ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ

на выпускную квалификационную работу студента Ларионовой Алены Александровны
специальность «38.04.07 Товароведение» группа M12116
на тему «Разработка технологии получения ценных протеинов в мицелиальных грибах
методами метаболической инженерии»
Руководитель ВКР канд. биол. наук, профессор Л.А. Балабанова
Дата защиты ВКР « 6 » июля 2018 г.

Перед студентом Ларионовой А. А. стояла задача разработки технологии получения ценных протеинов в мицелиальных грибах методами метаболической инженерии. Особенность задания заключалось в создании эффективных инструментов (экспрессионных векторов) для конструирования штаммов мицелиальных грибов с заданными свойствами как перспективных продуцентов биотехнологически значимых белков. Это позволит повысить эффективность штаммов микромицетов в усваивании грубых растительных субстратов, а также как продуцентов целевых продуктов за счет усовершенствования метаболического пути их биосинтеза. В дальнейшем использование этих конструкций может стать основой для разработки и организации крупнотоннажных биотехнологических производств сбалансированного кормового белка.

В настоящем исследовании был впервые разработан плазмидный вектор для трансформации и направленного синтеза рекомбинантных белков в мицелиальных грибах. С помощью новой высокоэффективной системы трансформации мицелиальных грибов был модифицирован термофильный микромицет *Th. thermophila* F-859 и показана возможность получения в его клетках кормовых белков из семян *Zea mays* и *Amaranthus hypochondriacus* L. с использованием сельскохозяйственных растительных остатков в качестве питательного субстрата.

Основными задачами данной работы были поиск оптимального маркера трансформации для термофильных и морских штаммов мицелиальных грибов; получение генетической конструкции на основе растительной плазмиды pSAT; оптимизация промоторов для направленного синтеза рекомбинантных белков в мицелиальных грибах;

оптимизация условий трансформации мицелиальных грибов и получение бинарного вектора для синтеза кормовых белков и/или целлюлолозолитических ферментов.

В ходе выполнения выпускной квалификационной работы студентом Ларионовой А. А. были выполнены поставленные задачи. Знания, полученные за время обучения, позволили освоить современные методы микробиологии и метаболической инженерии.

В целом, выпускная квалификационная работа выполнена на хорошем теоретическом и практическом уровне, соответствует требованиям, предъявляемым к подобным работам, рекомендуется к защите.

При проверке данной ВКР в системе «Антиплагиат», общее количество совпадений составило 23%.

Заключение: заслуживает оценки отлично и присвоения квалификации «магистр»

Руководитель ВКР канд. биол. наук, профессор

(ученая степень, ученое звание)



(подпись)

Л.А. Балабанова

(и.о. фамилия)

«03» июля 2018 г