

ВИКОРИСТАННЯ СИСТЕМИ CRISPR-CAS9 ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ ВИРОБНИЦТВА БІОПАЛИВА

Смірнова Я.А., Маринченко Л.В.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, yana.smirnova.sci@gmail.com

Abstract

The rising global energy demand and the environmental impact of fossil fuels emphasize the need for renewable sources. Biofuels are a promising alternative, and recent advances in genome editing, particularly CRISPR-Cas9, enable precise improvements in the mechanisms of biomass and lipid production. This technology helps to enhance biofuel yields, reduce costs, and support the development of sustainable energy solutions.

Keywords: CRISPR-Cas9, genome editing, biofuel, renewable energy

Вступ. Високий рівень використання та попиту на викопне паливо спричиняє зростання екологічних проблем щодо його сталого видобутку та наслідків у всьому світі. Головними із них є шкідливий вплив на цілісність екосистем, кліматичні зміни та вичерпання сировини [1]. Через це важливо шукати та покращувати відновлювальні джерела енергії, одними із яких є біопаливо. Останні досягнення у сфері редагування геному, зокрема технологія CRISPR-Cas9, відкрили нові перспективи для вдосконалення мікроорганізмів, що використовуються у виробництві біопалива. Завдяки точковим змінам у ДНК можна підвищити продуктивність біомаси, покращити синтез ліпідів та оптимізувати метаболічні шляхи, що напяму впливає на ефективність та економічну доцільність біопаливної галузі. Крім того, застосування CRISPR-Cas9 дає змогу подолати обмеження традиційних методів селекції, таких як тривалий час отримання результатів та низька специфічність.

Метою цієї роботи є дослідити варіанти застосування системи CRISPR-Cas9 у різних мікроорганізмів для підвищення ефективності виробництва біопалива.

Матеріали та методи. Аналітичний огляд наукових праць закордонних авторів за ключовими словами даної роботи. Літературний пошук здійснювали в таких наукових базах даних, як Scopus, NCBI та PubMed.

Результати та обговорення. Біопаливо – це відновлюване джерело енергії, що виробляється з біомаси, яка включає органічні матеріали, такі як сільськогосподарські культури, дерева та водорості [2]. Вони, в основному, поділяються на два типи: первинне та вторинне біопаливо. Первинне біопаливо зазвичай використовується в неочищеному вигляді для приготування їжі, опалення та виробництво електроенергії. Прикладами первинних біопалив є паливна деревина, пелети, тріска, залишки сільськогосподарських культур. Вторинне біопаливо – це очищена форма первинного біопалива, яка виробляється у вигляді твердих речовин (наприклад, деревне вугілля), рідин (наприклад, біодизель, біоетанол) або газів (наприклад, біогаз та водень). Вторинне біопаливо, яке використовується в транспортних засобах та численних промислових процесах, включає біодизель, біоетанол та біогаз. Вони виробляються шляхом біологічної переробки біомаси [1].

Існує також поділ на 4 покоління біопалива. Біопаливо першого покоління виробляється з харчових культур, таких як, кукурудза, пшениця, соя; з використанням цукру, крохмалю та олій для виробництва біоетанолу та біодизелю. Хоча ці культури дешеві і прості у виробництві, вони безпосередньо конкурують з продуктами харчування, сприяють вирубці лісів, втраті біорізноманіття і вимагають великого використання добрив, погіршуючи стан ґрунту і води [1].

Біопаливо другого покоління виробляють з нехарчової біомаси, такої як трава, деревина та сільськогосподарські відходи, зменшуючи конфлікт між продовольством і паливом та знижуючи витрати на сировину. Однак існують такі проблеми, як значні витрати на процеси попередньої обробки, складний хімічний розпад та логістичні проблеми зі збором і зберіганням біомаси.

Біопаливо третього покоління, в основному, використовує водорості, які можуть швидко рости в неорних умовах і давати високу врожайність біомаси, яку легше переробляти через менший вміст лігніну. Незважаючи на ці переваги, великомасштабне вирощування водоростей залишається витратним, енергоємним і часто все ще залежить від викопного палива.

Біопаливо четвертого покоління вдосконалює системи на основі водоростей, використовуючи генетично модифіковані (ГМ) штами для покращення таких характеристик, як уловлювання вуглецю та продуктивність, з метою створення палива з нульовим рівнем викидів вуглецю. Проте вони несуть значні екологічні ризики, такі як потенційний витік ГМО в природні екосистеми, а їх виробництво в промислових масштабах поки що не є економічно ефективним.

На цьому шляху технології редагування генів, такі як CRISPR-Cas, пропонують перспективні інструменти для покращення мікробіодоростей, екстремофілів, діатомових водоростей та інших організмів. CRISPR-Cas9 – це точний інструмент редагування геному, адаптований з природної системи захисту бактерій та архей, де він захищає від вірусних атак, націлюючись та розрізаючи чужорідну ДНК [3]. Система складається з двох компонентів: провідникової РНК (guide RNA), яка спрямовує фермент Cas9 до певної послідовності ДНК, і власне білка Cas9, який діє як молекулярні ножиці для розрізання ДНК. Механізм CRISPR-Cas9 працює в три основні етапи: адаптація, коли фрагменти чужорідної ДНК інтегруються в масив CRISPR; експресія, коли ці фрагменти транскрибуються в молекули РНК; і інтерференція, коли комплекс Cas9-гРНК розпізнає і розщеплює відповідні чужорідні послідовності ДНК [3].

CRISPR дає змогу точно налаштовувати метаболічні шляхи мікроорганізмів, щоб спрямовувати енергетичні потоки до бажаних біопаливних продуктів і пригнічувати конкуруючі процеси. У мікробіодоростях CRISPR-Cas9 впливає на гени, що беруть участь у метаболізмі ліпідів, фотосинтезі та фіксації вуглецю, щоб покращити виробництво біопалива. Конкретні мішені включають такі гени, які кодують фосфенолпіруваткарбоксилазу (*CrPEPC1*), зниження продукції якої сприяє збільшенню накопичення ліпідів, і зеаксантин-епоксидазу (*ZEP*), вимкнення експресії якої підвищує ефективність фотосинтезу і

виробництво біомаси. Для досліджень використовували *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis* spp. та *Chlorella* spp [4].

У екстремофілів технологія CRISPR-Cas націлена на гени, пов'язані з ферментативною активністю, термостійкістю та ефективністю метаболізму, щоб збільшити виробництво біопалива. Конкретні редаговані гени включають гени, що кодують целюлази, геміцелюлази, NADH-дегідрогеназу та піруваткіназу, які покращують розщеплення лігноцелюлозної біомаси та збільшують вихід етанолу або водню [1]. Модифікуючи ці гени, екстремофіли стають більш ефективними у перетворенні жорстких рослинних матеріалів на біопаливо, навіть за суворих промислових умов, таких як високі температури.

У діатомових водоростей CRISPR-Cas9 був використаний для впливу на певні гени з метою підвищення виробництва біопалива шляхом збільшення накопичення ліпідів. Ключові гени включають *ptTES1* (ген тіоестерази Hotdog-fold) у *Phaeodactylum tricornutum*, нокаут якого призводить до підвищення рівня триацилгліцерину (*TAG*), і *Thaps3_264297* (ген ліпази/фосфоліпази/ацилтрансферази) у *Thalassiosira pseudonana*, нокаут якого знизив катаболізм ліпідів і підвищив їх накопичення [3].

Висновки. Використання системи CRISPR-Cas9 для редагування геному мікроорганізмів відкриває нові можливості для підвищення ефективності виробництва біопалива. Генетичні модифікації, спрямовані на посилення метаболічних шляхів накопичення ліпідів або розщеплення біомаси, дають змогу отримувати більший вихід біопалива навіть у складних умовах. Хоча існують виклики, такі як низька трансформаційна ефективність і ризик позапланових мутацій, CRISPR-Cas9 залишається одним із найперспективніших інструментів для сталого розвитку біоенергетики в майбутньому.

Список використаної літератури:

1. Garg, D., Samota, M. K., Contis, N., Patel, N., Bala, S., & Rosado, A. S. (2023). Revolutionizing biofuel generation: Unleashing the power of CRISPR-Cas mediated gene editing of extremophiles. *Microbiological Research*, 127443. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127443>
2. El-Araby, R. (2024). Biofuel production: exploring renewable energy solutions for a greener future. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02571-9>
3. Kukreja, S., Gunarathne, S. M. S., Giri, T., Goutam, U., & Gautam, S. (2021). CRISPR-CAS9: A GENOME EDITING TOOL FOR IMPROVEMENT OF BIOFUEL PRODUCTION IN DIATOMS: A REVIEW. *PLANT ARCHIVES*, 21 (Suppliment-1), 202–209. <https://doi.org/10.51470/plantarchives.2021.v21.s1.035>
4. Dhokane, D., Shaikh, A., Yadav, A., Giri, N., Bandyopadhyay, A., Dasgupta, S., & Bhadra, B. (2023). CRISPR-based bioengineering in microalgae for production of industrially important biomolecules. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1267826>