

*На правах рукописи*



**Акентьев Филипп Игоревич**

**Исследование и инженерия метаболизма сорбитола у дрожжей  
*Komagataella kurtzmanii* для продукции рекомбинантных ферментов**

Специальность: 1.5.6. – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории систем экспрессии генов Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий (КК НБИКС-пт) НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва.

**Научный руководитель:** **Козлов Дмитрий Георгиевич**  
кандидат биологических наук, руководитель лаборатории систем экспрессии генов КК НБИКС-пт НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва.

**Официальные оппоненты:** **Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**  
доктор биологических наук, доцент, руководитель лаборатории функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва;

**Манухов Илья Владимирович**  
доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики Физтех-школы физики и исследований им. Ландау Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Долгопрудный.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва.

Защита диссертации состоится 28 ноября 2024 года, начало в 14:00, на заседании диссертационного совета 02.1.003.06 на базе НИЦ «Курчатовский институт» по адресу: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатовский институт» и на сайте [www.nrcki.ru](http://www.nrcki.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 02.1.003.06,  
кандидат биологических наук

А.С. Жирник

## Общая характеристика работы

### Актуальность и степень разработанности темы

Развитие современной биотехнологии связано с использованием рекомбинантных технологий для инженерии микроорганизмов. Это позволяет производить ферменты, метаболиты и пищевые добавки, улучшая качество кормов и продуктов (Arshad, Amid et al. 2014). Ферменты целлюлазного комплекса и протеазы широко применяются в различных технологических процессах в промышленности.

Метилотрофные дрожжи рода *Komagataella*, в частности *K. phaffii* (ранее *Pichia pastoris*), стали одними из самых эффективных систем экспрессии генов для производства рекомбинантных белков (Karbalaei, Rezaee et al. 2020, Gao, Jiang et al. 2021). Они не требовательны к условиям культивирования, обладают эффективной системой секреции и мощными промоторами, что делает их конкурентоспособными в сравнении с *E. coli* и *S. cerevisiae* (Macaulley-Patrick, Fazenda et al. 2005, Turkanoglu Ozcelik, Yilmaz et al. 2019).

Для экспрессии генов в *K. phaffii* часто используется промотор  $P_{AOXI}$ , индукция которого происходит в присутствии метанола. Хотя  $P_{AOXI}$  является одним из наиболее эффективных промоторов, его применение создает определенные неудобства из-за зависимости культуры от кислорода и тепловыделения в биореакторах, а также токсичности, что требует строгого контроля, особенно в пищевой промышленности (Hensing, Rouwenhorst et al. 1995, Krainer, Dietzsch et al. 2012).

Сорбитол — один из немногих источников углерода, не подавляющих активность  $P_{AOXI}$ , и может служить дополнительным субстратом при метанол-зависимом биосинтезе (Inan and Meagher 2001). Совместное использование сорбитола и метанола увеличивает синтез рекомбинантного белка (Gao, Zhan et al. 2015, Azadi, Mahboubi et al. 2017), снижает клеточный стресс и гибель клеток (Wang, Wang et al. 2010), уменьшает потребление кислорода и протеолитическую деградацию белков (Celik, Calik et al. 2009, Niu, Jost et al. 2013). Промежуточный продукт метаболизма метанола, формиат, также способен индуцировать  $P_{AOXI}$  и в перспективе может стать заменой метанолу (Tyurin and Kozlov 2015, Singh and Narang 2020, Liu, Zhao et al. 2022). Однако формиат является бедным источником углерода и энергии, что требует дополнительного субстрата. Это повышает ценность сорбитола, совместимого с индукцией формиатом.

Мультигенный филогенетический анализ показал, что *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* - близкородственные виды метилотрофных дрожжей (Naumov, Naumova et al. 2013). В ГосНИИгенетика (Москва) на основе штамма *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 (CBS 12817) разработали систему экспрессии генов, превосходящую аналог на основе *K. phaffii* (Matveeva, Gubaidullin et al. 2019, Gorbunov, Akentyev et al. 2021). Однако *K. kurtzmanii* не могут использовать сорбитол, маннитол или трегалозу как единственный источник углерода, что ограничивает их применение для производства рекомбинантных белков (Naumov, Naumova et al. 2013, Yang and Zhang 2018).

Таким образом исследования, направленные на повышение эффективности производства ферментов с использованием метилотрофных дрожжей, имеют важное промышленное значение. Отечественная система экспрессии на базе *K. kurtzmanii* обладает хорошими перспективами, и ее развитие путем инженерии метаболизма сорбитола

позволит расширить возможности ее применения для синтеза рекомбинантных белков и других органических молекул.

### **Цель и задачи**

**Целью** настоящей работы является изучение и модификация метаболизма сорбитола у дрожжей *Komagataella kurtzmanii* для повышения эффективности биосинтеза промышленно значимых белков, в том числе рекомбинантных ферментов ксилотриоксианазы Xgh12b *Aspergillus cervinus*, эндоглюканазы Egh12 *Thielavia terrestris* и катепсина L *Tribolium castaneum*.

В процессе работы решались следующие **задачи**:

- 1) Проанализировать особенности метаболизма сорбитола у метилотрофных дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*;
- 2) Предложить кандидатные молекулярно-генетические мишени, отвечающие за дефект *K. kurtzmanii* в усвоении сорбитола, и провести их экспериментальный анализ;
- 3) Используя методы генетической инженерии, сконструировать штаммы *K. kurtzmanii* с улучшенным усвоением сорбитола;
- 4) На базе штаммов *K. kurtzmanii* с улучшенным усвоением сорбитола сконструировать продуценты рекомбинантных ферментов: эндоглюканазы Egh12 *T. terrestris*, ксилотриоксианазы Xgh12b *A. cervinus* и катепсина L *T. castaneum*, и изучить влияние сорбитола на продукцию этих ферментов в условиях шейкерного культивирования;
- 5) Оценить преимущества полученных продуцентов в условиях культивирования в биореакторе с использованием подпитки с сорбитолом.

### **Научная новизна и практическая значимость**

В настоящей работе было проведено сравнительное изучение особенностей метаболизма сорбитола у дрожжей *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*, в ходе которого было подтверждено, что *K. kurtzmanii* обладал сниженной способностью к усвоению сорбитола. Были синтезированы рекомбинантные сорбитолдегидрогеназы дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, определены их физико-химические характеристики. Показано, что оба фермента обладали NAD<sup>+</sup> - зависимой активностью на сорбитоле и имели близкие биохимические свойства.

Далее гены сорбитолдегидрогеназ (*SOR1*) штаммов *K. phaffii* GS115 и *K. kurtzmanii* Y-727 будут обозначены *SDH115* и *SDH727*, соответственно.

Было установлено, что дефект в усвоении сорбитола у *K. kurtzmanii* был обусловлен пониженной экспрессией гена *SDH727* и удлиненным периодом адаптации клеток к росту на минимальной среде с сорбитолом, когда последний использовался в качестве единственного источника углерода. Было показано, что слабая экспрессия гена *SDH727* в дрожжах *K. kurtzmanii* определялась низкой активностью и без того слабого конститутивного промотора P<sub>SDH727</sub>.

В ходе работы было продемонстрировано, что метаболизм сорбитола был лимитирован экспрессией генов сорбитолдегидрогеназ у обоих видов дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*. С использованием генетической инженерии были получены модифицированные штаммы *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* с повышенной скоростью роста на сорбитоле  $\mu_{\max} = 0,06$ , в 3 раза превышавшей показатель базового штамма *K. phaffii* GS115.

Изучено влияние скорости усвоения сорбитола на уровень экспрессии  $P_{AOX1}$ -зависимых рекомбинантных генов, кодирующих ферменты термостабильной эндглюканазы Egh12 *T. terrestris*, ксилоглюканазы Xgh12b *A. cervinus* и катепсина L CathL *T. castaneum* в дрожжах *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*. Было показано, что практически во всех случаях увеличение скорости усвоения сорбитола клетками штаммов-продуцентов оказывало негативное влияние на уровень метанол-зависимого синтеза ферментов и позитивное влияние на рост клеточной биомассы. Однако, было обнаружено, что существует «компромиссная» скорость усвоения сорбитола (концентрация сорбитола в среде), способная стимулировать рост клеток без потери удельной продуктивности, что позволяет увеличить выход целевого белка на 15-30%.

Показано, что в условиях индукции метанолом удельная продуктивность штамма *K. kurtzmanii* - продуцента Egh12 в биореакторе может быть увеличена более чем в 2 раза за счет использования сорбитола в качестве дополнительного субстрата. При использовании сорбитола было достигнуто 2,5-кратное абсолютное увеличение количества синтезированного Egh12 по сравнению с базовыми условиями культивирования.

Таким образом, в ходе выполнения диссертационной работы были получены результаты, которые расширяют знания об особенностях метаболизма сорбитола у дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, в частности о регуляции генов *SDH*, свойствах ферментов, кодируемых этими генами, а также о влиянии сорбитола и скорости его усвоения на эффективность метанол-зависимой индукции. Полученные результаты могут найти применение при конструировании продуцентов на основе *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*, предназначенных для синтеза промышленно-значимых белков и ферментов, а также при выборе условий для их промышленного культивирования.

### **Методология и методы исследования**

В ходе выполнения работы применялись стандартные методики молекулярной биологии и биоинформатики. Для создания плазмид использовались традиционные методы генетической инженерии. В рамках исследования были разработаны генетически модифицированные штаммы-продуценты на основе дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*. Для них проводили анализ ростовых свойств и продуктивности в зависимости от условий культивирования. Были получены и изучены препараты рекомбинантных ферментов, включая анализ их физико-химических свойств. В исследовании проводилась оценка активности промоторов и терминаторов, основываясь на уровне синтеза  $\beta$ -галактозидазы (*lacZ*).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Экспрессия *SDH* лимитирует метаболизм сорбитола у дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*.
2. Сорбитолдегидрогеназы Sdh727 и Sdh115 штаммов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* являются  $NAD^+$  - зависимыми ферментами и имеют сходные физико-химические характеристики.
3. Промотор  $P_{SDH727}$  гена *SDH727* *K. kurtzmanii* обладает в 2 раза меньшей активностью по сравнению с промотором  $P_{SDH115}$  гена *SDH115* *K. phaffii*. Данный эффект, а также более

длительный период адаптации к сорбитолу определяют снижение ростовых показателей дрожжей *K. kurtzmanii* по сравнению с *K. phaffii* на среде с сорбитолом.

4. Интеграция в геном дополнительных копий рекомбинантного гена *SDH115 K. phaffii* приводит к получению модифицированных штаммов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* с улучшенным усвоением сорбитола и повышенной скоростью роста на средах с сорбитолом.

5. Использование модифицированных штаммов *K. kurtzmanii* в условиях шейкерного культивирования позволяет на 15-30% увеличить уровень биосинтеза эндоглюканазы Egh12 за счет оптимизации соотношения метанола и сорбитола в среде и улучшения роста клеток. В условиях культивирования в биореакторе использование сорбитола в 2 раза повышает удельную продуктивность модифицированных штаммов и приводит к 2,5-кратному увеличению производства фермента.

### **Личный вклад соискателя**

В данной научной работе автором лично были получены следующие результаты:

1. Выполнен сравнительный анализ геномов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* и предложен набор кандидатных генов для проверки их влияния на метаболизм сорбитола в дрожжах *K. kurtzmanii*;
2. Осуществлены все генно-инженерные работы и сконструированы все трансформанты, описанные в данной работе;
3. Получены препараты и изучены свойства рекомбинантных сорбитолдегидрогеназ;
4. Проведена оценка сравнительной активности промоторных и терминаторных областей генов сорбитолдегидрогеназ дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*;
5. Проанализирован биосинтез рекомбинантных ферментов клетками модифицированных штаммов в условиях шейкерного и биореакторного культивирования на средах различного состава;

Секвенирование и аннотация генома штамма *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 были выполнены Корженковым А.В., сотрудником лаборатории биоинформатики НИЦ «Курчатовский институт». Эксперименты по ферментации модифицированных 11 штаммов были проведены в сотрудничестве с Преображенским Р.М., сотрудником лаборатории технической микробиологии НИЦ «Курчатовский институт».

### **Публикации и апробация работы**

Результаты диссертационной работы представлены в 9 научных публикациях, в том числе в 4 статьях в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, и в 1 патенте.

Материалы диссертации были опубликованы в виде стендовых и устных докладов на XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2019); XVI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием "Пищевые технологии и биотехнологии" (Казань, 2019); 25-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2022); XXII Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2023).

## Основное содержание работы

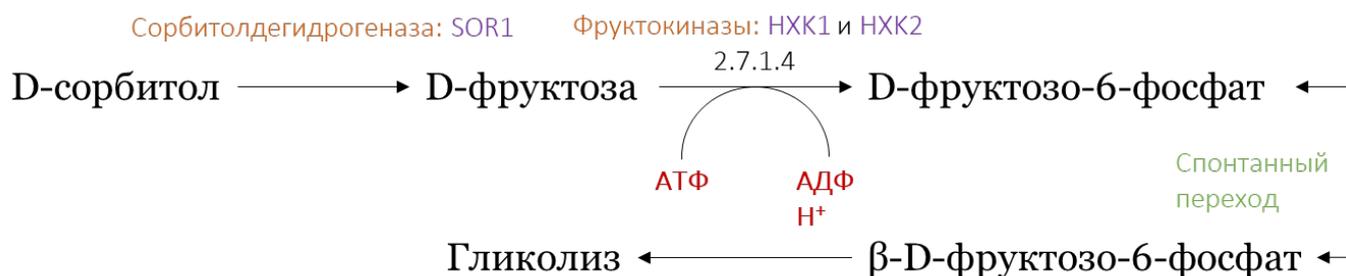
С целью развития системы экспрессии генов проведено изучение особенностей метаболизма сорбитола в клетках дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, в результате которого получены модифицированные штаммы с улучшенным усвоением сорбитола. На их основе получены продуценты ферментов, которые были использованы для оценки влияния сорбитола на эффективность метанол-индуцируемого синтеза целевых белков.

### 1. Исследование и модификация метаболизма сорбитола у *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*

#### 1.1. Метаболизм сорбитола у дрожжей

Метаболизм сорбитола в клетках дрожжей наиболее полно изучен у *S. cerevisiae*. Транспорт D-сорбитола у дрожжей осуществляется по механизму облегченной диффузии за счет неспецифических транспортеров гексоз (Kruckeberg 1996, Jordan, Choe et al. 2016, Zhang, Chen et al. 2019). После попадания в клетку D-сорбитол конвертируется в кето-D-фруктозу под действием сорбитолдегидрогеназы 1 (SOR1) – NAD<sup>+</sup>-зависимого фермента с ионом Zn<sup>2+</sup> (Sarthy, Schopp et al. 1994). Затем D-фруктоза превращается в β-D-фруктозу, которая фосфорилируется гексокиназами HXK1 и HXK2 и ассимилируется по гликолитическому пути (рис. 1) (Bisson and Fraenkel 1983).

Основные транспортеры углеводов в клетках *K. phaffii* принадлежат семейству Major facilitator superfamily (MFS) (De Schutter, Lin et al. 2009), что предполагает схожий с *Saccharomyces* механизм транспорта сорбитола. Однако экспериментально транспорт углеводов в *K. phaffii* изучен только для глюкозы и глицерина (Mattanovich, Graf et al. 2009).



**Рисунок 1.** Схема внутриклеточного процесса ассимиляции сорбитола у *S. cerevisiae*.

По данным мультигенного и фенотипического анализа *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* являются близкородственными организмами, которые, однако, определяются как разные виды (Naumov, Naumova et al. 2013). *K. kurtzmanii* имеет ряд фенотипических особенностей по сравнению с *K. phaffii*, среди которых неспособность расти на средах, где сорбитол, маннитол или трегалоза являются единственными источниками углерода. (Naumov, Naumova et al. 2013, Heistingner, Dohm et al. 2022). В связи с тем, что фруктоза является полноценным субстратом для роста обоих организмов (Naumov, Naumova et al. 2013), было выдвинуто предположение, что метаболизм сорбитола у *K. kurtzmanii* нарушен на стадии транспорта в клетку, либо на этапе конверсии во фруктозу. При этом *K. phaffii*, очевидно, обладает всеми генами, необходимыми для ассимиляции сорбитола, и наиболее вероятная

причина нарушения аналогичного процесса у *K. kurtzmanii* заключается в мутациях в одном или нескольких ортологах этих генов.

## **1.2. Секвенирование генома дрожжей *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727. Поиск генов, способных участвовать в метаболизме сорбитола, и их сравнительный анализ**

Для выявления кандидатных генов, способных принимать участие в метаболизме сорбитола и их последующего сравнения с контрольными ортологами из клеток штамма *K. phaffii* GS115, было проведено полногеномное секвенирование и аннотирование генома штамма *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 (данные доступны в NCBI GenBank под номером GCA\_022533605.1). По данным филогенетического анализа, проведенного на основе новых данных, наиболее близкий к *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 геном принадлежит типовому штамму *K. phaffii* CBS 7435, на базе которого сконструирован коммерческий штамм GS115, со значением средней нуклеотидной идентичности (ANI) в 98,04%.

С целью поиска потенциальных транспортеров сорбитола в базе данных Uniprot из числа всех аннотированных белков штамма *K. phaffii* GS115 были выбраны все подтвержденные и предполагаемые трансмембранные каналы. Среди результатов поиска были выбраны такие белковые последовательности, которые: а) имели высокую гомологию (>90%) с известными трансмембранными транспортерами углеводов и б) были классифицированы как белки из суперсемейства Major Facilitator Superfamily (MFS) с неизвестной специфичностью. В итоге в геноме *K. phaffii* было выявлено 15 субстрат-специфичных каналов, лигандами которых могли быть известные углеводороды, и 17 каналов семейства MFS с неизвестными лигандами. Почти для всех из них в геноме *K. kurtzmanii* имелись соответствующие ортологи. Затем, из их числа были выделены 4 кандидатных гена, ортологи которых в геноме *K. kurtzmanii* содержали значительные мутации либо не были обнаружены вовсе.

В дополнение к генам-кандидатам, кодировавшим потенциальные транспортеры, для последующего анализа был отобран также ген сорбитолдегидрогеназы *SDH115* *K. phaffii* (PAS\_chr1-1\_0490), несмотря на то что геном *K. kurtzmanii* содержал собственный ген *SDH727*, обладавший высокой гомологией с *SDH115*. Основанием для выбора послужила ключевая роль сорбитолдегидрогеназы в метаболизме сорбитола, и в этой связи любые изменения в структуре фермента могли иметь критическое влияние на его активность.

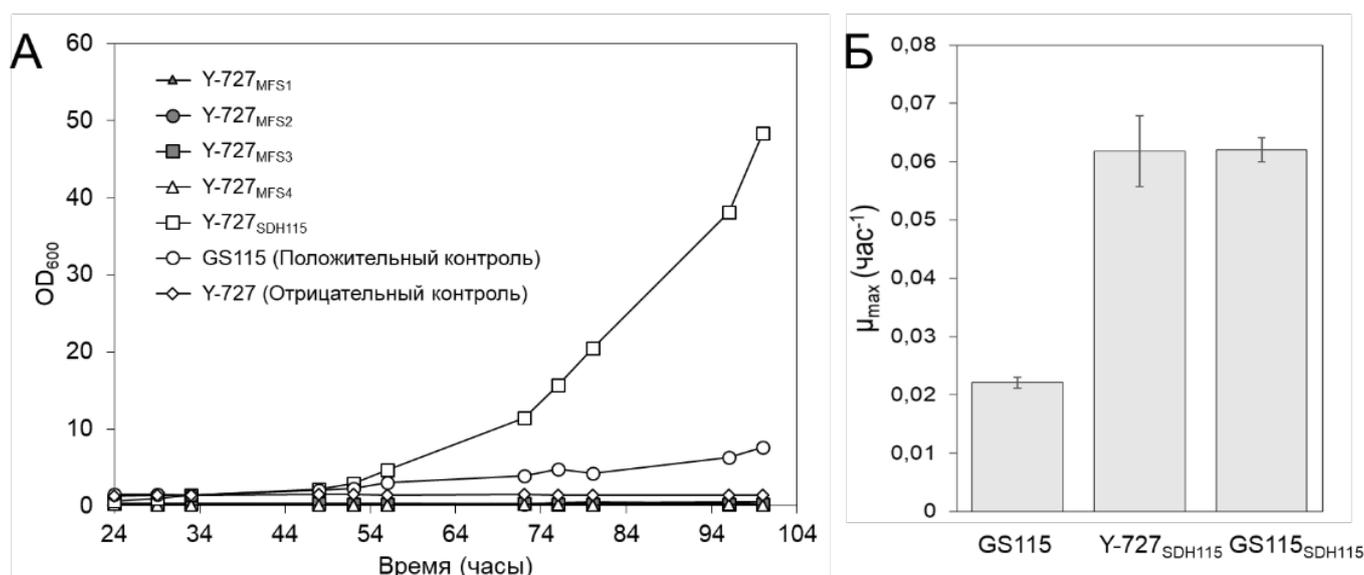
## **1.3. Комплементационный анализ**

Для установления роли кандидатных генов в метаболизме сорбитола в клетках *K. kurtzmanii* использовали комплементационный анализ. Последовательности выбранных генов *K. phaffii* были амплифицированы и интегрированы в геном штамма *K. Kurtzmanii* Y-727  $\Delta his4$  (табл. 1). Интеграция происходила в дистальную область промотора  $P_{AOXI}$  без нарушения функциональной активности последнего. При этом каждый ген был амплифицирован со своей собственной промоторной областью, в роли терминаторной области во всех случаях использовалась соответствующая последовательность гена *AOXI* *K. kurtzmanii*.

**Таблица 1.** Штаммы *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, использованные для проведения комплементационного анализа.

| Организм             | Название штамма         | Способ получения  |
|----------------------|-------------------------|---|
| <i>K. kurtzmanii</i> | Y-727                   | -   |
|                      | Y-727 <sub>MFS1</sub>   | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOXI</sub> ::HIS4, PAS_chr2-1_0006 – T <sub>AOXI</sub> |
|                      | Y-727 <sub>MFS2</sub>   | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOXI</sub> ::HIS4, PAS_chr4_0011 – T <sub>AOXI</sub>   |
|                      | Y-727 <sub>MFS3</sub>   | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOXI</sub> ::HIS4, PAS_chr3_0760 – T <sub>AOXI</sub>   |
|                      | Y-727 <sub>MFS4</sub>   | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOXI</sub> ::HIS4, PAS_chr1-4_0621 – T <sub>AOXI</sub> |
|                      | Y-727 <sub>SDH115</sub> | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOXI</sub> ::HIS4, PAS_chr1-1_0490 – T <sub>AOXI</sub> |
| <i>K. phaffii</i>    | GS115                   | -   |
|                      | GS115 <sub>SDH115</sub> | GS115 P <sub>AOXI</sub> ::HIS4, PAS_chr1-1_0490 – T <sub>AOXI</sub>               |

Анализ ростовых свойств полученных трансформантов проводили на жидкой синтетической среде с сорбитолом в качестве единственного источника углерода (YNBS). В условиях эксперимента контрольный штамм *K. kurtzmanii* Y-727 продемонстрировал полное отсутствие роста (рис. 2А).



**Рисунок 2.** (А) Динамика роста трансформантов *K. kurtzmanii* в зависимости от интегрированного гена *K. phaffii* GS115; (Б) Значение максимальной скорости роста исходного штамма *K. phaffii* GS115 и модифицированных *K. kurtzmanii* Y-727<sub>SDH115</sub> и *K. phaffii* GS115<sub>SDH115</sub>.

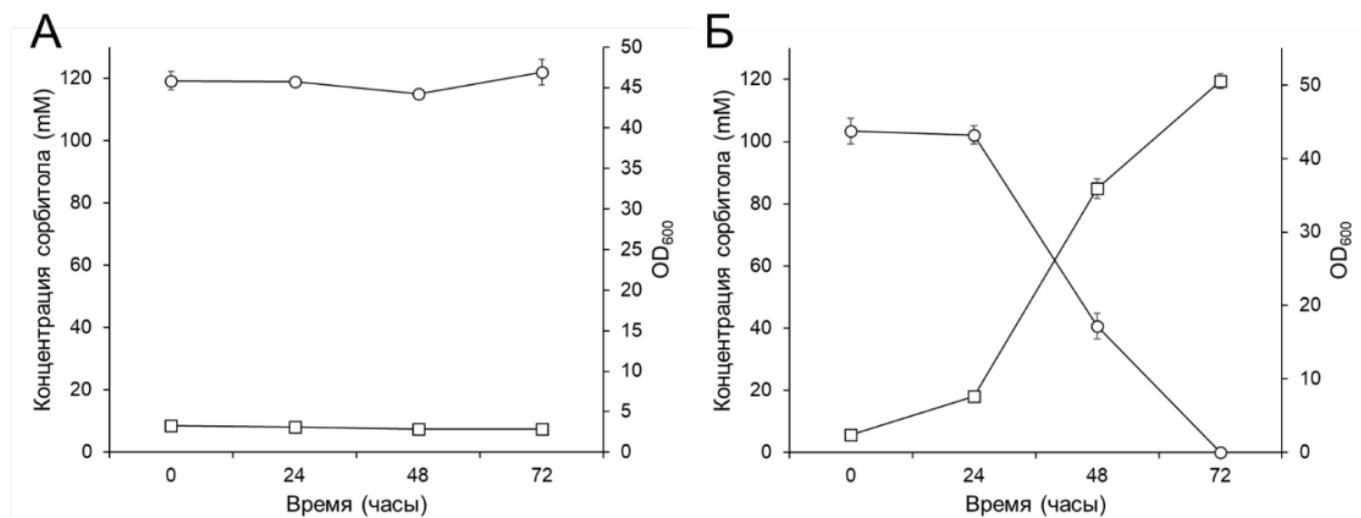
Отсутствие роста сохранялось также у штаммов Y-727<sub>MFS1</sub>, Y-727<sub>MFS2</sub>, Y-727<sub>MFS3</sub> и Y-727<sub>MFS4</sub>, которые после трансформации содержали гены транспортеров из группы MFS (рис. 2А). В то же время трансформанты Y-727<sub>SDH115</sub>, получившие ген сорбитолдегидрогеназы *SDH115*, значительно улучшили свои ростовые характеристики. Причем показатель их скорости роста,  $\mu_{\max} = 0,06$ , в три раза превысил показатель контрольного штамма *K. phaffii* GS115 (рис. 2Б).

Рост штаммов Y-727 и Y-727<sub>SDH115</sub> на среде YNBS однозначно коррелировал с их способностью к усвоению сорбитола. Так, концентрация сорбитола в среде и плотность

клеток контрольного штамма Y-727 оставались постоянными на протяжении 72 часов (рис. 3А). В то же время рост штамма Y-727<sub>SDH115</sub> сопровождался полным истощением сорбитола в среде (рис. 3Б).

Таким образом, по результатам комплементационного анализа из пяти генов-кандидатов только ген *SDH115* показал положительный результат. Его введение в клетки *K. kurtzmanii* стимулировало рост трансформантов за счет усвоения сорбитола.

Интересно, что трансформанты GS115<sub>SDH115</sub>, получившие дополнительную копию *SDH115*, продемонстрировали аналогичное ускорение роста на сорбитоле: их показатель  $\mu_{\max}$  также увеличился до 0,06 (рис. 2Б).



**Рисунок 3.** Зависимость оптической плотности (квадраты) и концентрации сорбитола (круги) в минеральной среде YNBS для штаммов Y-727 (А) и Y-727<sub>SDH115</sub> (Б).

Поскольку геном *K. kurtzmanii* содержал собственный ген сорбитолдегидрогеназы *SDH727*, полученный результат означал, что, его свойства, по-видимому, критически отличались от свойств рекомбинантного *SDH115*, что и определяло дефектный фенотип *K. kurtzmanii*.

Чтобы изучить функциональную активность гена *SDH727*, было проведен его нокаут в клетках *K. kurtzmanii*. В результате интеграции кассеты для разрушения *SDH727* в клетки штамма Y-727  $\Delta his4$  был получен трансформант Y-727  $\Delta sdh727$ .

Фенотипы исходного штамма Y-727 с неповрежденным геном *SDH727* и трансформанта Y-727  $\Delta sdh727$  с инактивированным геном *SDH727* были проанализированы на синтетической, жидкой и агаризованной средах с сорбитолом (YNBS). На жидкой среде клетки исходного штамма Y-727 поддерживали жизнеспособность на протяжении, как минимум, 100 часов. На агаризованной среде через 10 дней культивирования этот штамм формировал небольшие колонии. В это же время штамм Y-727  $\Delta sdh727$  показал падение плотности клеток на жидкой среде и отсутствие роста колоний на агаризованной среде.

Анализ показал, что функциональная активность гена *SDH727* достаточна для сохранения жизнеспособности клеток *K. kurtzmanii*, но не обеспечивает полноценный рост, равный росту *K. phaffii*. Дефект в утилизации сорбитола у штамма Y-727 дикого типа мог быть связан либо с пониженной активностью фермента Sdh727, либо с пониженной

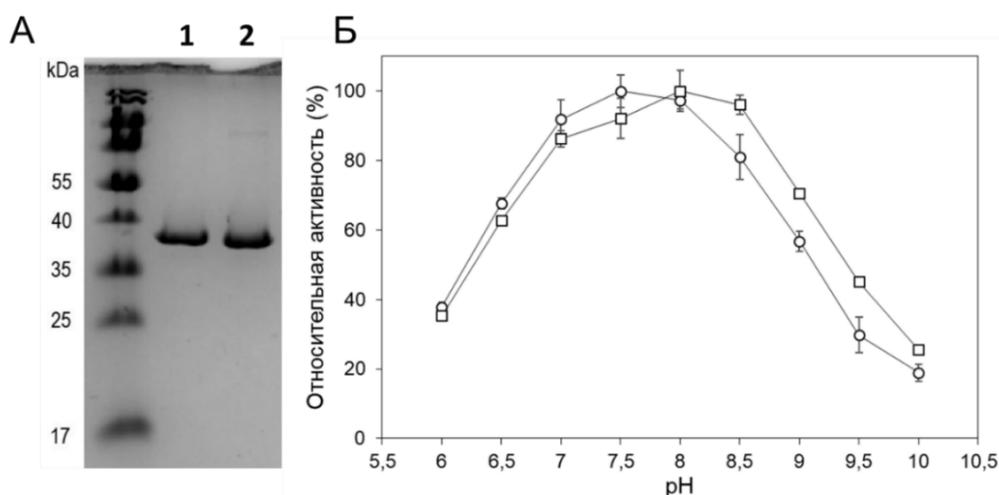
экспрессией гена *SDH727*. Далее был проведен сравнительный анализ сорбитолдегидрогеназ и экспрессии генов *SDH*.

#### 1.4. Сравнительная характеристика ферментов Sdh115 и Sdh727

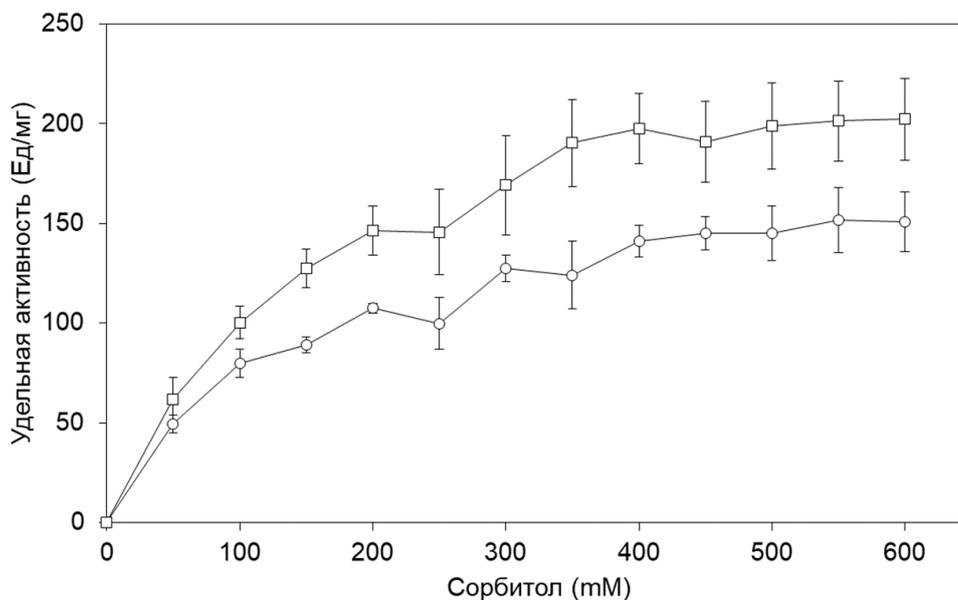
Была проведена амплификация структурных генов сорбитолдегидрогеназ *SDH115* и *SDH727* и интеграция их в вектор pPH727 под контролем промотора P<sub>AOX1</sub> *K. kurtzmanii*. С использованием полученных плазмид на базе штамма дрожжей *K. kurtzmanii* Y-727 *Δhis4* были сконструированы продуценты сорбитолдегидрогеназ Sdh115 и Sdh727 и осуществлен синтез и металл-хелатная хроматография (рис. 4А).

В результате анализа *in vitro* Sdh115 и Sdh727 характеризовались близкими, но не идентичными показателями pH-оптимумов активности: pH 7,5 и pH 8,0, соответственно (рис. 4Б).

Зависимость активности ферментов от концентрации субстрата определяли в Tris-HCl буфере при pH 8,0. В качестве кофермента использовали NAD<sup>+</sup>, концентрацию сорбитола в реакционной смеси изменяли в диапазоне от 50 до 600 мМ (рис. 5). На основании полученных данных были рассчитаны кинетические параметры обоих ферментов (табл. 2).



**Рисунок 4.** (А) Электрофореграмма очищенных ферментов Sdh115 (1) и Sdh727 (2). (Б) Относительная активность рекомбинантных сорбитолдегидрогеназ Sdh115 (круги) и Sdh727 (квадраты) в зависимости от pH.



**Рисунок 5.** Зависимость активности рекомбинантных сорбитолдегидрогеназ Sdh115 (кружки) и Sdh727 (квадраты) от концентрации сорбитола.

**Таблица 2.** Физико-химические свойства сорбитолдегидрогеназ Sdh115 и Sdh727.

| Фермент | Расчётный молекулярный вес, кДа | pH - оптимум | $K_m$ , мМ        | $V_{max}$ , Ед/мг  |
|---------|---------------------------------|--------------|-------------------|--------------------|
| Sdh115  | 38,26                           | 7,5          | $133,3 \pm 7,27$  | $163,93 \pm 10,52$ |
| Sdh727  | 38,23                           | 8,0          | $157,83 \pm 18,5$ | $256,4 \pm 30,05$  |

Не только Sdh115, но и Sdh727 обладал выраженной активностью, при этом оба белка демонстрировали близкие значения pH-оптимумов,  $V_{max}$  и  $K_m$ .

Таким образом, 6 аминокислотных замен, отличавших Sdh727 и Sdh115, хотя и отражались на свойствах ферментов *in vitro*, вряд ли могли оказать критическое влияние на ростовые показатели дрожжей и определять разницу в усвоении сорбитола между дрожжами *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*.

### 1.5. Сравнительная оценка экспрессии *SDH115* и *SDH727*

Как известно, к числу регуляторных областей относятся не только промоторные, но и терминаторные участки генов (Ito, Terai et al. 2020). В этой связи аналитические конструкции, синтезированные с целью поиска различий в активности регуляторных элементов генов *SDH727* и *SDH115*, включали разные сочетания промоторных и терминаторных элементов обоих генов. Репортерным геном в составе конструкций служил ген  $\beta$ -галактозидазы *lacZ*. Оценку экспрессии *lacZ* проводили в клетках штаммов *K. kurtzmanii* Y-727  $\Delta his4$  и *K. phaffii* GS115, в геном которых были интегрированы соответствующие конструкции (табл. 3). Трансформированные штаммы выращивали на среде комплексного состава с глюкозой (YPD) или сорбитолом (YPS), и измеряли удельные показатели активности  $\beta$ -галактозидазы.

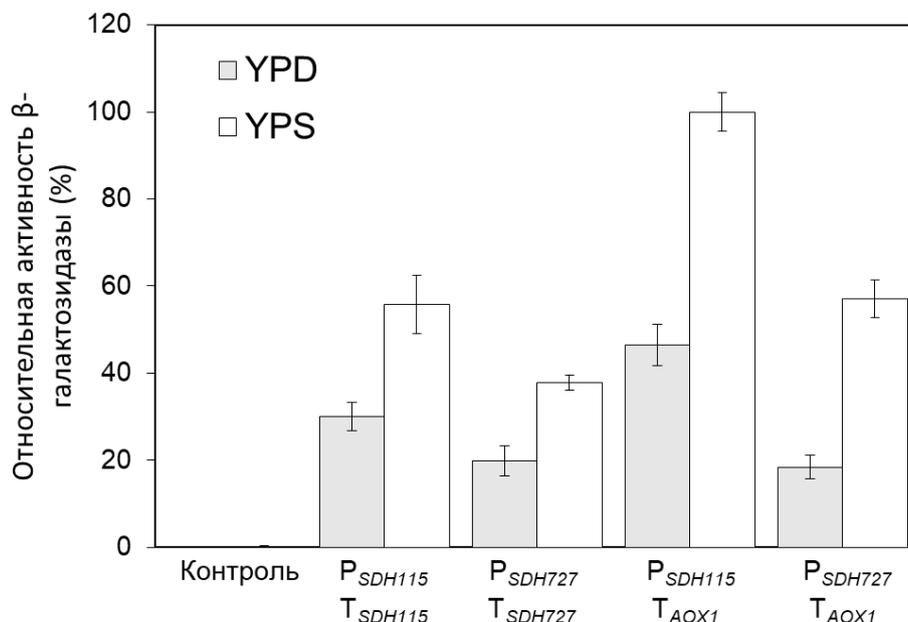
**Таблица 3.** Штаммы дрожжей и особенности генетических конструкций, использованных для анализа активности промоторных и терминаторных элементов генов *SDH115* и *SDH727*.

| Организм             | Название штамма                                   | Способ получения  |
|----------------------|---|---|
| <i>K. kurtzmanii</i> | Y-727 (P <sub>SDH115</sub> /T <sub>SDH115</sub> ) | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOX1</sub> ::HIS4, P <sub>SDH115</sub> -lacZ-T <sub>SDH115</sub> |
|                      | Y-727 (P <sub>SDH727</sub> /T <sub>SDH727</sub> ) | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOX1</sub> ::HIS4, P <sub>SDH727</sub> -lacZ-T <sub>SDH727</sub> |
|                      | Y-727 (P <sub>SDH115</sub> /T <sub>AOX1</sub> )   | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOX1</sub> ::HIS4, P <sub>SDH115</sub> -lacZ-T <sub>AOX1</sub>   |
|                      | Y-727 (P <sub>SDH727</sub> /T <sub>AOX1</sub> )   | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOX1</sub> ::HIS4, P <sub>SDH727</sub> -lacZ-T <sub>AOX1</sub>   |
|                      | Y-727 (P <sub>SDH115</sub> /T <sub>SDH727</sub> ) | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOX1</sub> ::HIS4, P <sub>SDH115</sub> -lacZ-T <sub>SDH727</sub> |
|                      | Y-727 <sub>SDH115(F)</sub>                        | Y-727 $\Delta his4$ P <sub>AOX1</sub> ::HIS4, PAS_chr1-1_0490                               |
| <i>K. phaffii</i>    | GS115 (P <sub>SDH115</sub> /T <sub>AOX1</sub> )   | GS115 P <sub>AOX1</sub> ::HIS4, P <sub>SDH115</sub> -lacZ-T <sub>AOX1</sub>                 |
|                      | GS115 (P <sub>SDH727</sub> /T <sub>AOX1</sub> )   | GS115 P <sub>AOX1</sub> ::HIS4, P <sub>SDH727</sub> -lacZ-T <sub>AOX1</sub>                 |

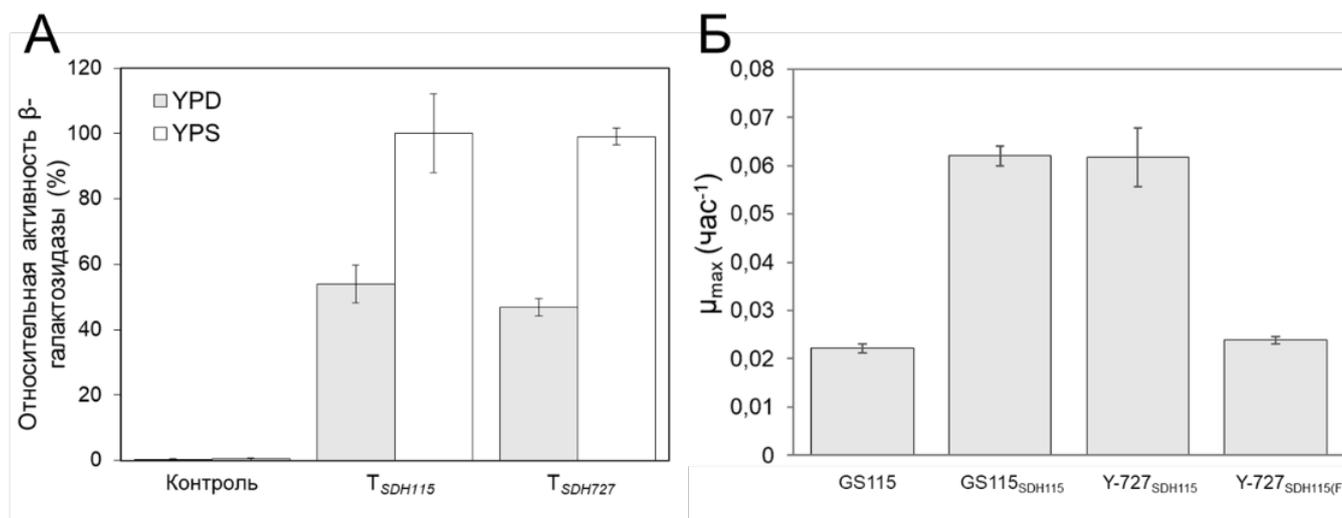
Независимо от набора регуляторных элементов, уровень экспрессии репортерных конструкций на среде YPS с сорбитолом был выше, чем на среде YPD с глюкозой (рис. 6). Мы обнаружили, что сорбитол обладает модулирующим эффектом на P<sub>SDH</sub> – зависимый синтез, хотя прежде P<sub>SDH</sub> был охарактеризован как конститутивный промотор, активность которого не зависела от источника углерода (Periyasamy, Govindappa et al. 2013).

Как видно на рис. 6, уровень экспрессии *lacZ* под управлением регуляторных элементов P<sub>SDH115</sub> и T<sub>SDH115</sub> гена *SDH115* был выше, чем под контролем пары элементов P<sub>SDH727</sub> и T<sub>SDH727</sub> гена *SDH727*. Вдобавок к этому, сравнение активности промоторов в клетках штаммов Y-727 (P<sub>SDH115</sub>/T<sub>AOX1</sub>) и Y-727 (P<sub>SDH727</sub>/T<sub>AOX1</sub>) также показало, что экспрессия *lacZ* под контролем P<sub>SDH115</sub> в 2-2,5 раза превышала показатели конструкции с P<sub>SDH727</sub> (рис. 6).

Полученные результаты также позволили судить о функциональной активности терминаторных областей *SDH*. Замена T<sub>SDH727</sub> и T<sub>SDH115</sub> в составе обеих репортерных конструкций на T<sub>AOX1</sub> привела к увеличению синтеза *lacZ* на среде на среде YPS с сорбитолом, а в случае P<sub>SDH115</sub> – и на среде с глюкозой. Полученные результаты свидетельствовали о вкладе терминаторов транскрипции в экспрессию генов *SDH* и о высокой функциональной активности T<sub>AOX1</sub>. Другая серия измерений свидетельствовала о функциональной эквивалентности терминаторных областей T<sub>SDH115</sub> и T<sub>SDH727</sub> (рис. 7А)



**Рисунок 6.** Зависимость активности  $\beta$ -галактозидазы от комбинации регуляторных элементов, определяющих экспрессию *lacZ* в клетках *K. kurtzmanii*. Под каждой диаграммой указаны промотор и терминатор, использованные в репортёрных конструкциях с геном *lacZ*.

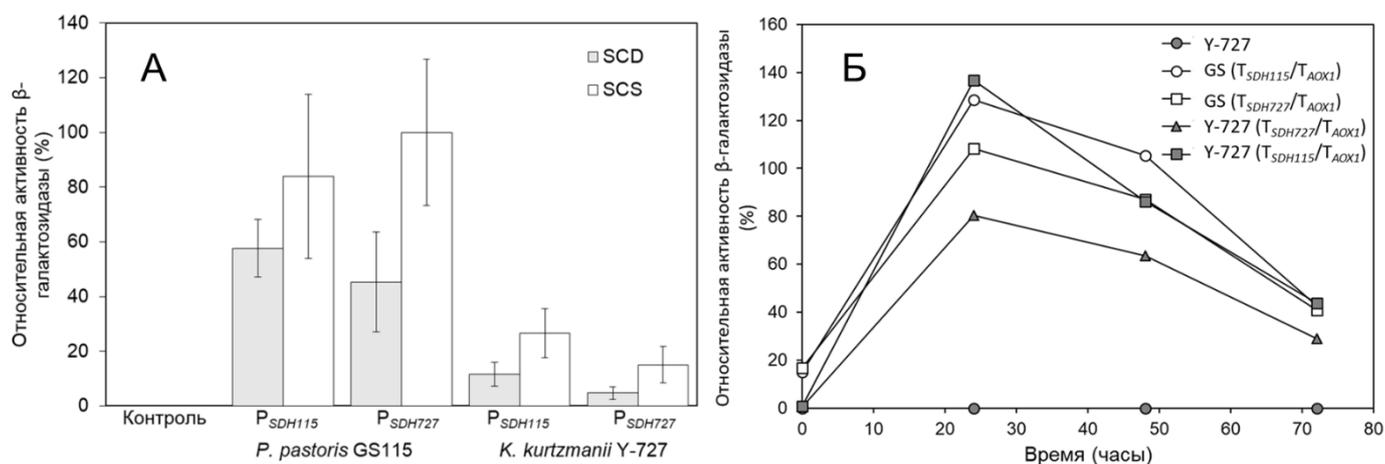


**Рисунок 7.** (А) Относительная активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках штаммов Y-727 ( $P_{SDH115}/T_{SDH115}$ ) и Y-727 ( $P_{SDH115}/T_{SDH727}$ ). (Б) Сравнение скорости роста штаммов дрожжей на минимальной среде с сорбитолом.

Результаты секвенирования показали, что  $P_{SDH727}$  отличается от  $P_{SDH115}$  всего четырьмя нуклеотидными заменами, которые снижают активность промотора  $P_{SDH727}$  в 2-2,5 раза по сравнению с  $P_{SDH115}$  в клетках *K. kurtzmanii*. Разница в активности промоторов объясняет дефектный фенотип дрожжей *K. kurtzmanii* по отношению к ассимиляции сорбитола. Увеличенная скорость роста штаммов Y-727<sub>SDH115</sub> и GS115<sub>SDH115</sub> на среде с сорбитолом частично обусловлена интеграцией гена *SDH115* с терминаторной областью  $T_{AOX1}$ . Штамм Y-727<sub>SDH115(F)</sub> с дополнительным геном *SDH115* и естественной терминаторной последовательностью показал удельную скорость роста  $\mu_{max} = 0,02$  (рис. 7Б).

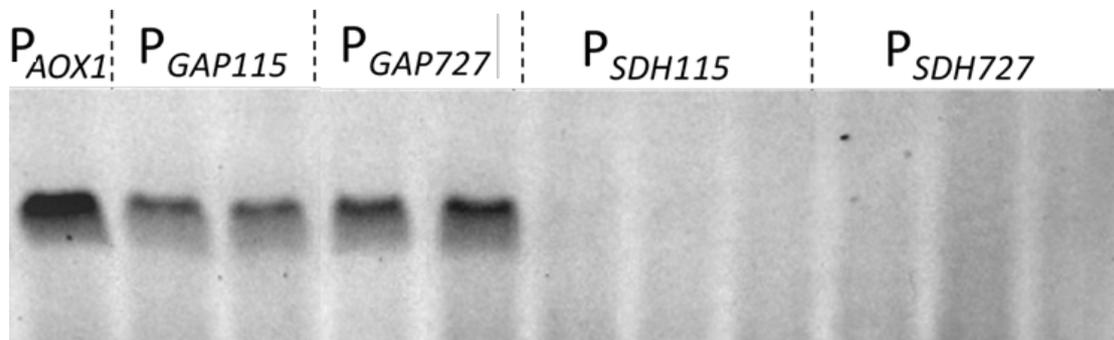
Как известно, активность промоторов зависит от внутренних генетических факторов конкретного организма (генетическое окружение) и от условий культивирования. Для того, чтобы оценить влияние этих факторов штаммы Y-727 ( $P_{SDH115}/T_{AOX1}$ ), Y-727 ( $P_{SDH727}/T_{AOX1}$ ), GS115 ( $P_{SDH115}/T_{AOX1}$ ) и GS115 ( $P_{SDH727}/T_{AOX1}$ ) культивировали на минеральной синтетической среде с глюкозой (SCD) и сорбитолом (SCS) и измеряли активность  $\beta$ -галактозидазы.

Замена среды не изменила соотношение между активностями промоторов в клетках *K. kurtzmanii*: активность  $P_{SDH115}$  по-прежнему в 2-2,5 раза превышала  $P_{SDH727}$  (рис. 8А). В это же время в клетках *K. phaffii* достоверной разницы в активности этих промоторов не наблюдалось. При этом на ранних этапах культивирования в клетках *K. phaffii* синтезировалось в 3-6 раз больше  $\beta$ -галактозидазы, чем в клетках *K. kurtzmanii*. Однако, данный эффект исчезал спустя 24 часа культивирования (рис. 8Б). Это означало, что дрожжам *K. kurtzmanii* требовалось больше времени для адаптации и синтеза белка на синтетической среде.



**Рисунок 8. (А) Синтез  $\beta$ -галактозидазы в репортерных штаммах дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, выращенных в течение 6 часов на минимальной среде с глюкозой (SCD) или сорбитолом (SCS). Под диаграммами указан состав репортерных конструкций с геном *lacZ*. Во всех конструкциях использовали  $T_{AOX1}$ . (Б) Кинетика синтеза  $\beta$ -галактозидазы под контролем промоторов  $P_{SDH}$  в дрожжах *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*. Трансформированные штаммы выращивали в течение 72 часов на синтетической среде SCD с глюкозой.**

Для оценки абсолютного уровня активности промоторов  $P_{SDH}$  в клетках дрожжей мы использовали секретлируемый репортерный белок фосфолипазу  $Pla2ng$  (Chereregine, Malysheva et al. 2021). В тестах также использовались промоторы  $P_{SDH727}$ ,  $P_{SDH115}$ ,  $P_{AOX727}$ ,  $P_{GAP115}$  и  $P_{GAP727}$ . Промоторы  $P_{SDH115}$  и  $P_{SDH727}$  практически не обладают активностью по сравнению с  $P_{GAP}$ , который уступает  $P_{AOX727}$  в 2-3 раза (рис. 9). Это подтверждает, что промотор  $P_{SDH727}$  в *K. kurtzmanii* слабый, а не сильный, как считалось ранее (Periyasamy, Govindappa et al. 2013). Низкая активность  $P_{SDH727}$  не обеспечивает достаточный синтез сорбитолдегидрогеназы. Интеграция одной дополнительной копии гена, увеличивающая уровень сорбитолдегидрогеназы в 2-3 раза, заметно улучшает усвоение сорбитола.



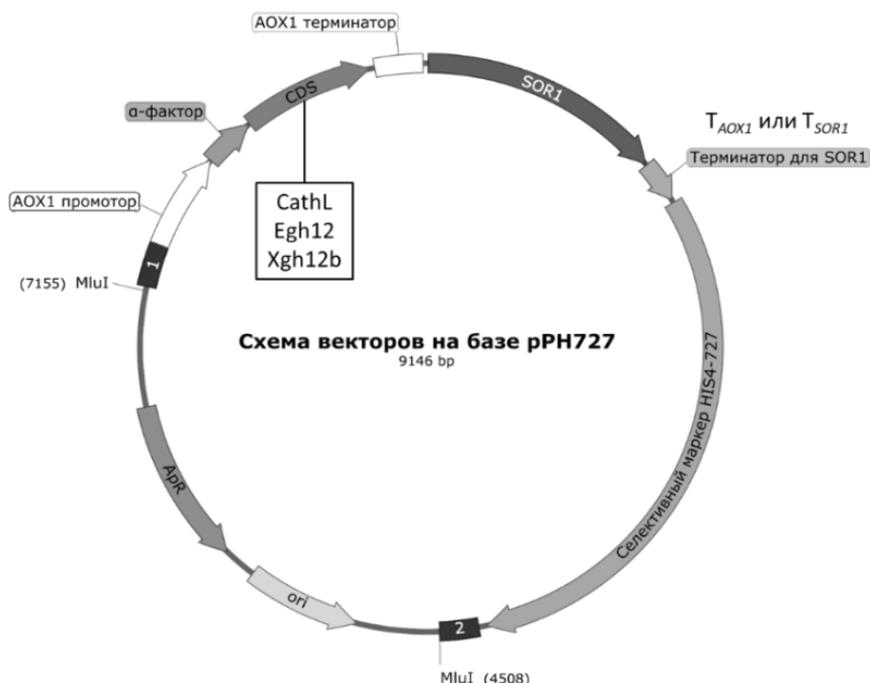
**Рисунок 9.** Электрофореграмма культуральной жидкости (КЖ) дрожжей *K. kurtzmanii*, продуцентов фосфолипазы Pla2ng. Над рисунком указаны промоторы, регулировавшие экспрессию фосфолипазы:  $P_{GAP115}$  и  $P_{SDH115}$  – промоторы генов *GAP* и *SDH115* дрожжей *K. phaffii*;  $P_{AOX1}$ ,  $P_{GAP727}$  и  $P_{SDH727}$  – промоторы генов *AOX1*, *GAP* и *SDH727* дрожжей *K. kurtzmanii*. На форец наносили КЖ, полученную от 2 или 3 независимо полученных продуцентов.

Таким образом, несмотря на наличие в геноме дрожжей *K. kurtzmanii* функционального гена *SDH727*, его экспрессия была критически низкой и не обеспечивала рост на сорбитоле. Основной причиной низкой экспрессии и дефектного фенотипа был промотор  $P_{SDH727}$ , а также замедленная адаптация дрожжей к минимальной среде.

## **2. Анализ рекомбинантного синтеза ферментов модифицированными штаммами *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* в условиях индукции метанолом**

### **2.1. Получение штаммов-продуцентов *K. kurtzmanii* с улучшенным усвоением сорбитола для практического применения**

В качестве потенциально ценных рекомбинантных белков для синтеза в дрожжах были выбраны термостабильная эндголюканаза Egh12 *Thielavia terrestris*, ксилоглюканаза Xgh12b *Aspergillus cervinus* и катепсин L CathL *Tribolium castaneum*. Для их экспрессии в дрожжах *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* были сконструированы наборы интегративных векторов (рис. 10) и соответствующих трансформантов (табл. 4). Помимо гена целевого фермента часть векторов содержали копию гена *SDH115* с собственной терминаторной областью  $T_{SDH115}$  или с  $T_{AOX1}$ .



**Рисунок 10.** Схема плазмид, сконструированных на основе вектора pRH727 (Matveeva, Gubaidullin et al. 2019) для получения штаммов-продуцентов рекомбинантных ферментов CathL, Egh12 и Xgh12b. Интеграция кассеты направлялась в дистальную область промотора  $P_{AOX1}$  по областям гомологии, обозначенными на схеме 1 и 2.

**Таблица 4.** Характеристика штаммов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, сконструированных для производства секретируемых рекомбинантных ферментов CathL, Egh12 и Xgh12b.

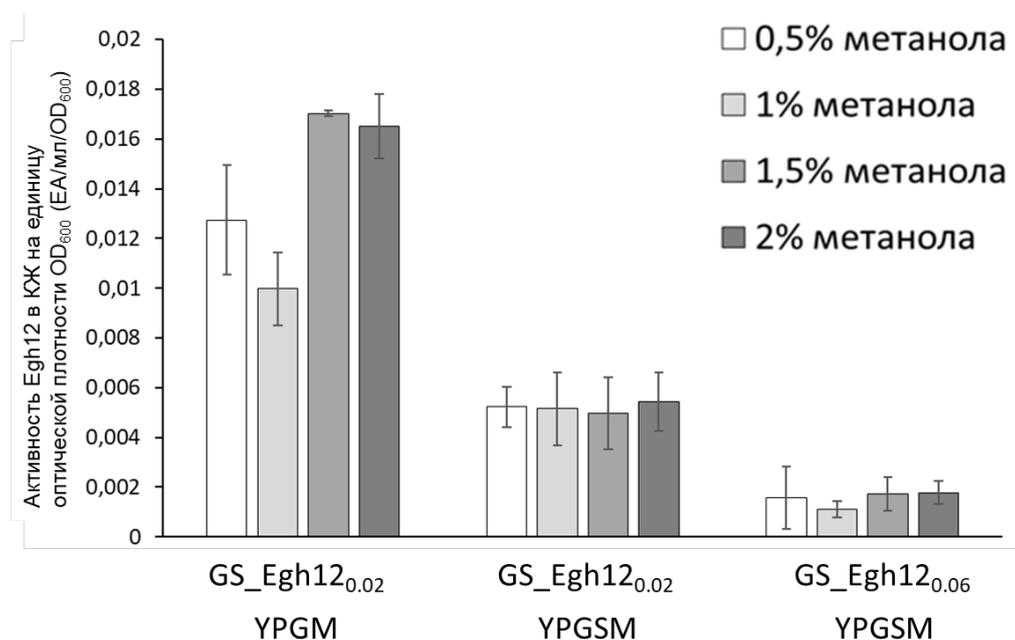
| Реципиентный штамм   | Продуцируемый целевой белок | Штамм-продуцент         | Дополнительная копия гена <i>SDH115</i> | $\mu_{max}$ |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------|---|-------------|
| <i>K. phaffii</i>    | CathL                       | GS_CathL <sub>02</sub>  | нет                                     | 0,02        |
|                      |                             | GS_CathL <sub>06</sub>  | <i>SDH115</i> - $T_{AOX1}$              | 0,06        |
|                      | Egh12                       | GS_Egh12 <sub>02</sub>  | нет                                     | 0,02        |
|                      |                             | GS_Egh12 <sub>06</sub>  | <i>SDH115</i> - $T_{AOX1}$              | 0,06        |
|                      | Xgh12b                      | GS_Xgh12b <sub>02</sub> | нет                                     | 0,02        |
|                      |                             | GS_Xgh12b <sub>06</sub> | <i>SDH115</i> - $T_{AOX1}$              | 0,06        |
| <i>K. kurtzmanii</i> | CathL                       | Y_CathL                 | нет                                     | 0           |
|                      |                             | Y_CathL <sub>02</sub>   | <i>SDH115</i> - $T_{SDH115}$            | 0,02        |
|                      |                             | Y_CathL <sub>06</sub>   | <i>SDH115</i> - $T_{AOX1}$              | 0,06        |
|                      | Egh12                       | Y_Egh12                 | нет                                     | 0           |
|                      |                             | Y_Egh12 <sub>02</sub>   | <i>SDH115</i> - $T_{SDH115}$            | 0,02        |
|                      |                             | Y_Egh12 <sub>06</sub>   | <i>SDH115</i> - $T_{AOX1}$              | 0,06        |
|                      | Xgh12b                      | Y_Xgh12b                | нет                                     | 0           |
|                      |                             | Y_Xgh12b <sub>02</sub>  | <i>SDH115</i> - $T_{SDH115}$            | 0,02        |
|                      |                             | Y_Xgh12b <sub>06</sub>  | <i>SDH115</i> - $T_{AOX1}$              | 0,06        |

## 2.2. Влияние соотношения метанола и сорбитола на синтез целевых белков

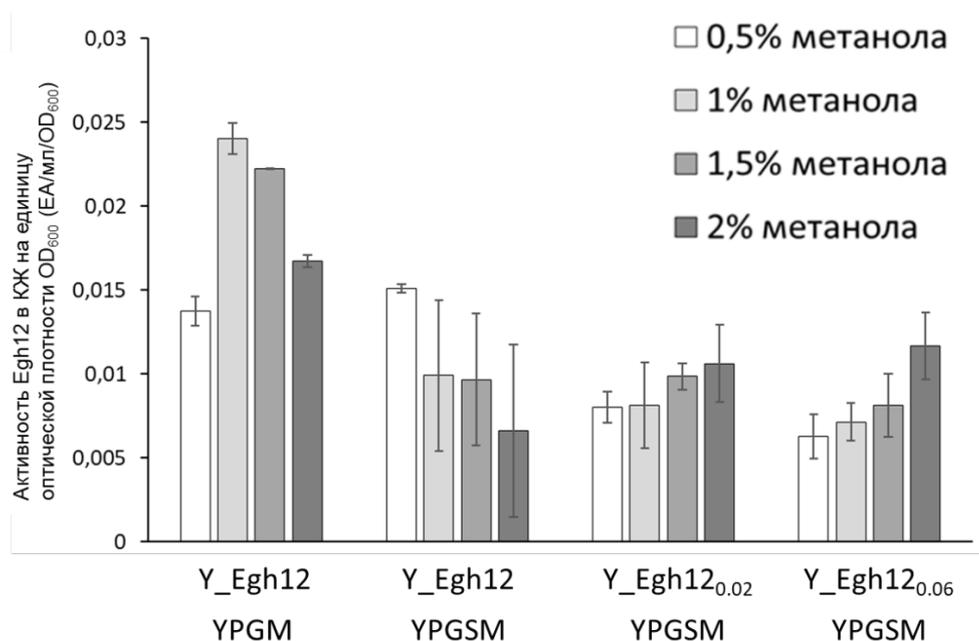
Ранее сообщалось, что подпитка сорбитолом во время метанол-зависимого синтеза штаммами *K. phaffii* позволяет снизить потребность в количестве используемого метанола без ущерба для конечного выхода целевого продукта (Azadi, Mahboubi et al. 2017, Karbalaei, Rezaee et al. 2020).

Влияние соотношения метанола и сорбитола в среде культивирования дрожжей *K. phaffii* и *K. kurtzmanii* на синтез целевого белка оценивали с использованием штаммов-продуцентов Egh12, выращивая их на среде комплексного состава, содержащей 300 мМ сорбитола. Синтез целевого белка индуцировали метанолом, внесенным в среду в различной концентрации. Накопление целевого белка в культуральной жидкости оценивали с помощью измерения активности Egh12 (рис. 11 и 12).

Как показали полученные результаты, на среде YPGM в отсутствие сорбитола рост штаммов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* коррелировал с концентрацией внесенного метанола, при этом штаммы показывали разные профили индукции. Удельная продукция Egh12 клетками дрожжей *K. phaffii* достигала максимума при индукции 1,5 - 2% (об/об) метанолом, в то время как максимальная синтез Egh12 клетками *K. kurtzmanii* происходил в присутствии 1% индуктора. Более того, в оптимальных условиях клетки *K. kurtzmanii* синтезировали в 1,4 раза большее количество Egh12 по сравнению с *K. phaffii*.



**Рисунок 11.** Активность Egh12 на единицу оптической плотности (Ед/мл/OD<sub>600</sub>) в КЖ штаммов *K. phaffii* после 72-часовой индукции метанолом. Названия штаммов и сред, использованных в эксперименте, приведены под диаграммами.



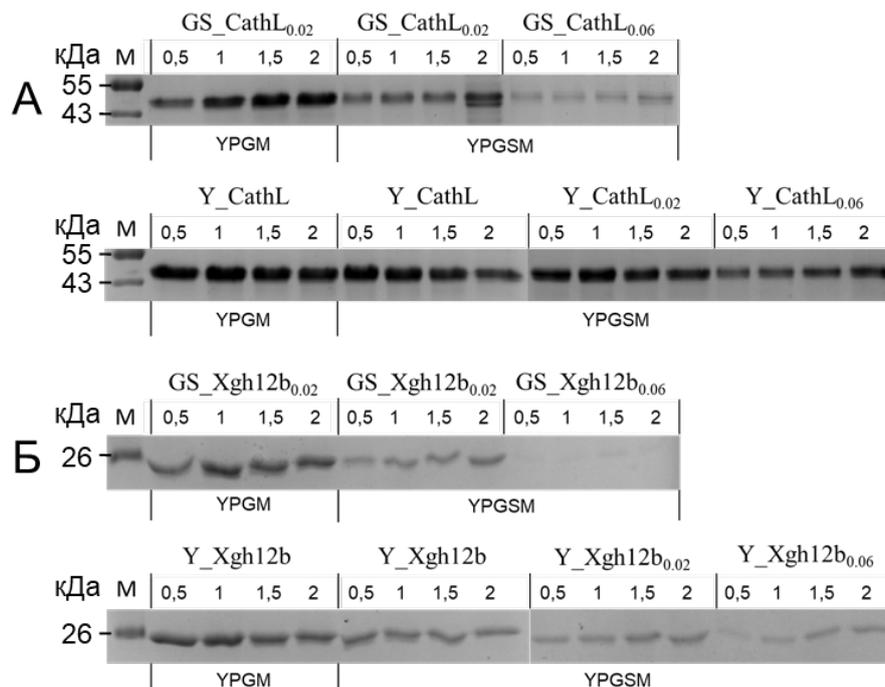
**Рисунок 12.** Активность Egh12 на единицу оптической плотности (Ед/мл/OD<sub>600</sub>) в КЖ штаммов *K. kurtzmanii* после 72-часовой индукции метанолом. Названия штаммов и сред, использованных в эксперименте, приведены под диаграммами.

Присутствие сорбитола в культуральной среде (YPGSM) приводило к увеличению ростовых показателей всех без исключения исследуемых штаммов. Интересно, что оптическая плотность штамма Y\_Egh12, не усваивающего сорбитол, на среде с сорбитолом YPGSM также в 1,5-2 раза превышала его показатель на среде YPGM. Вероятно, в условиях роста на органической среде с метанолом, медленное, одновременное с метанолом усвоение сорбитола культурой и привело к увеличенной оптической плотности на YPGSM.

Все штаммы–продуценты, в геном которых были интегрированы дополнительные копии гена *SDH*, обнаружили снижение удельной продукции целевого белка на среде YPGSM по сравнению с контролем. Так, например, показатели штамма GS\_Egh12<sub>02</sub> на среде с сорбитолом снижались в 2-3 раза, тогда как показатели GS\_Egh12<sub>06</sub> – в 5-7 раз (рис. 11). Такое же снижение синтеза было характерно почти для всех продуцентов *K. kurtzmanii* (рис. 12).

Эффект негативного влияния сорбитола не проявлялся у штамма Y\_Egh12, не содержащего дополнительных копий гена *SDH*. При индукции 0,5% метанолом этот штамм показал равенство удельных показателей (Ед/мл/OD<sub>600</sub>) синтеза Egh12 на обеих средах, но на среде с сорбитолом достигал в 1,5 раза более высокой оптической плотности. Это означает, что штамм Y\_Egh12 увеличил синтез Egh12 пропорционально приросту биомассы.

Анализ влияния сорбитола и метанола на синтез CathL и Xgh12b показал, что наиболее эффективный синтез этих белков продуцентами *K. phaffii* и *K. kurtzmanii* достигался на среде YPGM без сорбитола (рис. 13). Максимумы удельной продуктивности *K. kurtzmanii* соответствовали концентрациям метанола 0,5-1,0%, а у *K. phaffii* – 1,5-2,0%. Продуценты *K. kurtzmanii* синтезировали белки с большей эффективностью по сравнению с *K. phaffii*.

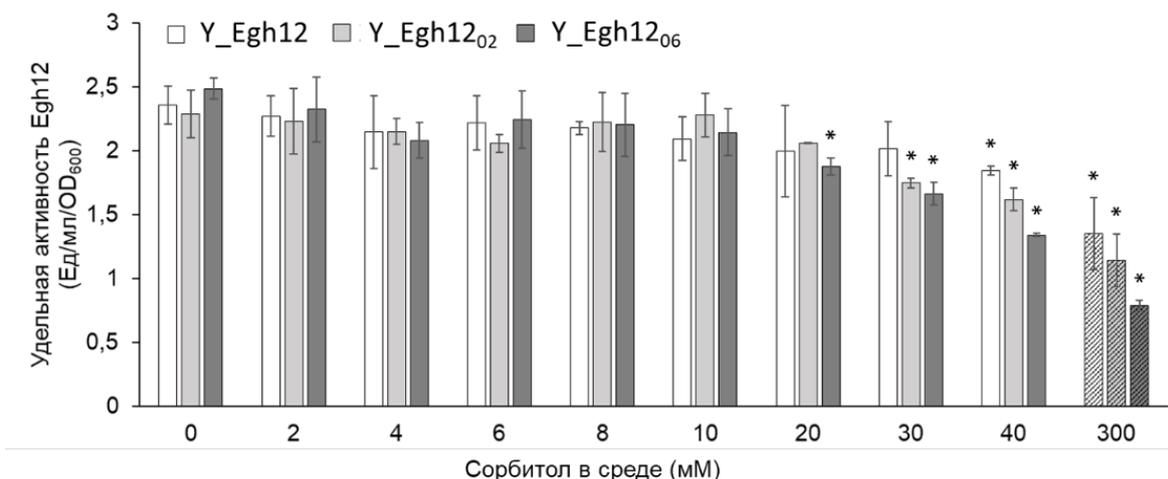


**Рисунок 13.** Электрофореграмма образцов культуральной жидкости штаммов-продуцентов белков CathL (А) и Xgh12b (Б). Штаммы культивировали на средах YPGM и YPGSM, различавшихся присутствием сорбитола (300 мМ). В гель наносили объем культуральной жидкости, пропорциональный оптической плотности культур ( $OD_{600}$ ). Над дорожками указано количество метанола (% , об/об), которое использовали для индукции, а также название штамма. Также обозначены названия сред, на которых проводили культивирование.

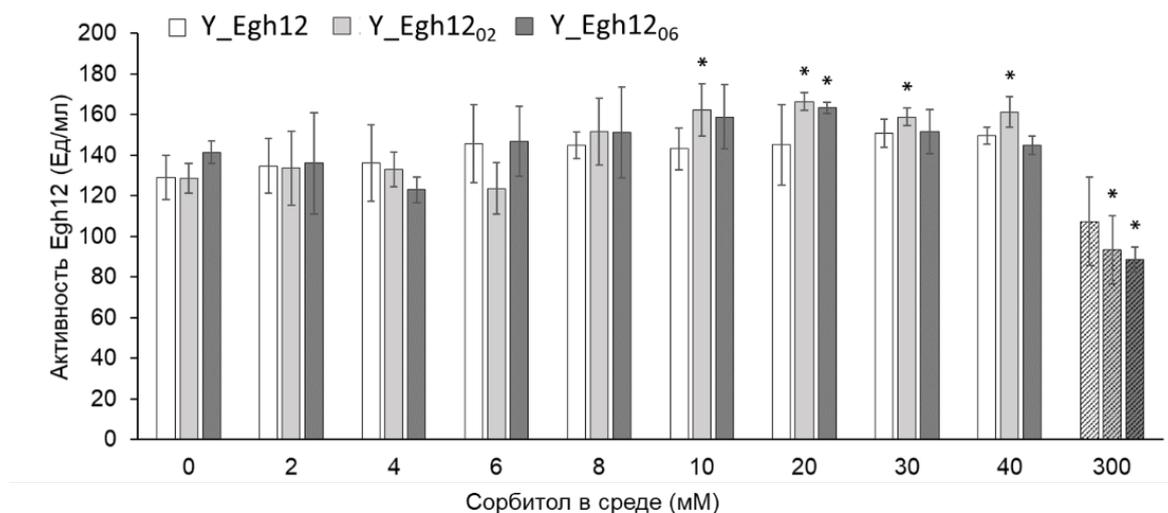
Таким образом, полученные результаты показали, что присутствие сорбитола в среде для культивирования и увеличение скорости роста штаммов дрожжей на такой среде за счёт дополнительной копии *SDH15* вызвали значительное снижение удельной продукции целевых белков. Однако, поскольку указанные эффекты были обнаружены на среде с высокой концентрацией сорбитола (300 мМ), они могли отражать влияние сорбитола на продуктивные свойства штаммов именно в этих условиях.

### 2.3. Влияние концентрации сорбитола в среде на эффективность индукции метанолом

Для изучения эффектов в широком диапазоне концентраций сорбитола были выбраны штаммы *K. kurtzmanii*, продуценты Egh12 (табл. 4). Для анализа использовали среды YPGSM, в которые сорбитол вносили каждые 24 часа до различной конечной концентрации в диапазоне от 0 до 40 мМ; метанол вносили до 1% (об/об) каждые 24 часа. Результаты измерения активности Egh12 на единицу оптической плотности (Ед/мл/ $OD_{600}$ ) и объемной (Ед/мл) активности Egh12 в среде культивирования дрожжей представлены на рис. 14 и 15, соответственно.



**Рисунок 14.** Зависимость активности Egh12 на единицу оптической плотности (Ед/мл/OD<sub>600</sub>) в образцах культуральной жидкости штаммов *K. kurtzmanii* от содержания сорбитола в среде. Для сравнения на диаграмме также приведены полученные ранее показатели продукции Egh12 на среде YPGSM, содержавшей 300 мМ сорбитола (заштрихованные столбцы). Звездочками обозначены показатели штамма на среде с сорбитолом, достоверно ( $\alpha = 0,05$ ) отличавшиеся от контрольных величин, полученных на среде без сорбитола.



**Рисунок 15.** Зависимость объемной активности Egh12 (Ед/мл) в образцах культуральной жидкости штаммов *K. kurtzmanii* от содержания сорбитола в среде. Для сравнения на диаграмме также приведены полученные ранее показатели продукции Egh12 на среде YPGSM, содержавшей 300 мМ сорбитола (заштрихованные столбцы). Звездочками обозначены показатели штамма на среде с сорбитолом, достоверно ( $\alpha = 0,05$ ) отличавшиеся от контрольных величин, полученных на среде без сорбитола.

Как показали полученные результаты, достоверное снижение удельной продуктивности исследуемых штаммов наблюдалось лишь на средах, в которые вносили 20 мМ сорбитола и более. При этом чем большей скоростью роста обладал штамм на среде с сорбитолом, тем меньшая концентрация сорбитола в среде требовалась для снижения продуктивности. Так, уменьшение удельной продукции штаммом Y\_Egh12<sub>06</sub>

наступало уже при внесении 20 мМ сорбитола, для Y\_Egh12<sub>02</sub> - при 30 мМ, а для Y\_Egh12 только при 40 мМ сорбитола.

Достоверное увеличение объемной активности Egh12 в КЖ (Ед/мл) наблюдалось для штамма Y\_Egh12<sub>02</sub> в диапазоне концентраций сорбитола от 10 до 40 мМ, а для Y\_Egh12<sub>06</sub> – только при концентрации 20 мМ.

В культуральной жидкости штаммов Y\_Egh12<sub>02</sub> и Y\_Egh12<sub>06</sub>, выращенных на среде, в которую ежедневно вносили 20 мМ сорбитола, определили объемную активность Egh12. Она составила 166 Ед/мл и 163 Ед/мл соответственно, что приблизительно на 30% и 15% превышало аналогичные показатели продуцентов на среде без сорбитола (рис. 15).

Таким образом, как нам удалось показать, повышенный метаболизм сорбитола, зависевший от концентрации сорбитола в среде и уровня экспрессии *SDH115*, оказывал негативное влияние на удельные показатели метанол-индуцированного синтеза белков в дрожжах *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*.

В то же время, как мы установили, при определенном ограничении метаболизма сорбитола показатели роста и удельной продуктивности дрожжей на среде с сорбитолом оказывались выше, чем на контрольной среде без сорбитола. В этом случае сорбитол в качестве дополнительного источника углерода стимулировал рост биомассы и вызывал увеличение объемной продукции целевых белков.

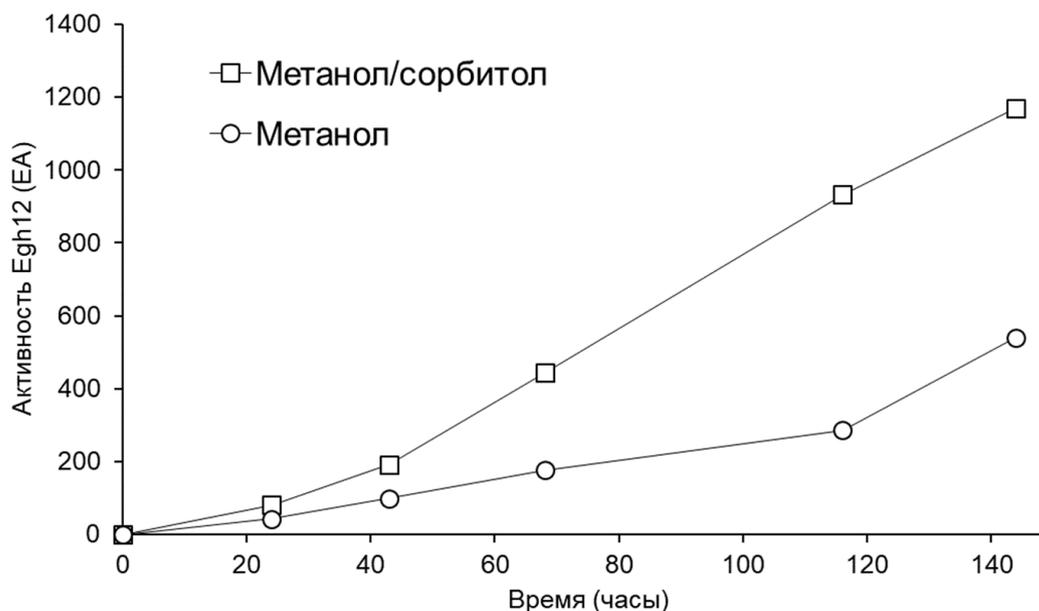
#### 2.4. Индукция смесью сорбитол/метанол штамма Y\_Egh12<sub>02</sub> в биореакторе

Эффект от применения сорбитола для культивирования дрожжей в биореакторе изучали с использованием модифицированного штамма *K. kurtzmanii* Y\_Egh12<sub>02</sub>, способного к ассимиляции сорбитола на уровне штамма *K. phaffii* GS115. Штамм культивировали на органической среде (YPG), подпитку осуществляли 50% метанолом (контроль) или смесью 50% метанола и 12,5% сорбитола. Культивирование проводили в два этапа: на первом этапе клетки выращивали на среде с глицерином, на втором, после исчерпания глицерина, включали подпитку метанолом или смесью сорбитол/метанол. Индукцию проводили в течение 144 часов; продукцию фермента оценивали по активности. Полученные результаты представлены в табл. 5 и на рис. 16.

**Таблица 5.** Показатели синтеза Egh12 продуцентом Y\_Egh12<sub>02</sub> после 144 часов индукции метанолом или смесью сорбитол/метанол.

| Показатели                      | Подпитка    |                  |
|---------------------------------|-------------|------------------|
|                                 | Метанол     | Метанол/Сорбитол |
| Сухая клеточная биомасса, г/л   | 39 ± 8      | 42 ± 11          |
| Активность Egh12, ЕА/мл         | 527 ± 13    | 1270 ± 99        |
| Концентрация Egh12, г/л         | 0,91 ± 0,02 | 2,2 ± 0,17       |
| Объемная продуктивность, ЕА/ч/л | 3621 ± 28   | 8852 ± 722       |
| Удельная продуктивность, ЕА/ч/г | 96 ± 20     | 232 ± 78         |

Как видно из полученных данных, подпитка среды сорбитолом не сопровождалась увеличением клеточной биомассы штамма Y\_Egh12<sub>02</sub>. В то же время синтез целевого фермента увеличился в 2,6 раза и составил 2,2 грамма белка на литр среды (табл. 5).



**Рисунок 16.** Динамика накопления Egh12 в культуральной жидкости продуцента  $Y\_Egh12_{02}$ . Показано накопление активности фермента (ЕА) в ферментёре в условиях индукции метанолом (круги) и смесью метанол/сорбитол (квадраты).

Ранее в условиях шейкерного культивирования мы наблюдали повышение объемной продукции Egh12 только за счет роста клеточной биомассы, но не за счёт удельной продуктивности самих клеток. В биореакторе мы также зафиксировали рост общей продуктивности, которая в этот раз, однако, обусловлена ростом удельной продуктивности (ЕА в час на 1 грамм клеток) культуры, которая увеличилась более чем в 2 раза.

Таким образом, полученные результаты говорят о том, что позитивные эффекты, вызванные ассимиляцией сорбитола в биореакторе в условиях индукции метанолом, ранее наблюдавшиеся только для *K. phaffii* (Gao, Zhan et al. 2015, Azadi, Mahboubi et al. 2017), теперь стали доступны и для модифицированных производных *K. kurtzmanii*. Полученные результаты дают основание полагать, что дальнейшее исследование позволит более полно раскрыть потенциал модифицированных штаммов дрожжей *K. kurtzmanii* и оптимизировать их использование для производства ферментов в биореакторах в условиях подпитки сорбитолом.

## Выводы

1. С использованием комплементационного анализа показано, что увеличение числа копий гена сорбитолдегидрогеназы в геноме дрожжей *K. kurtzmanii* обеспечивает полное устранение дефекта в усвоении сорбитола и повышает скорость роста модифицированных штаммов на среде с сорбитолом до  $\mu_{max} = 0,06$ .
2. Показано, что рекомбинантные сорбитолдегидрогеназы дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* являются NAD<sup>+</sup> - зависимыми ферментами и обладают близкими физико-химическими свойствами.
3. Установлено, что промотор P<sub>SDH727</sub> гена сорбитолдегидрогеназы дрожжей *K. kurtzmanii* обладает в два раза меньшей активностью по сравнению с промотором P<sub>SDH115</sub> дрожжей *K. phaffii*, при том, что оба промотора следует отнести к числу крайне низкоактивных, а терминаторные области T<sub>SDH115</sub> и T<sub>SDH727</sub> генов сорбитолдегидрогеназ дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* обладают близкими свойствами и являются взаимозаменяемыми.
4. Установлено, что основными причинами дефектного фенотипа, выявляемого при росте дрожжей *K. kurtzmanii* на синтетической среде с сорбитолом, являются пониженная активность промотора гена сорбитолдегидрогеназы, а также замедленная адаптация клеток к условиям роста.
5. Показано, что в условиях шейкерного культивирования на средах с метанолом и сорбитолом модифицированные штаммы дрожжей *K. kurtzmanii*, различающиеся скоростью усвоения сорбитола и продуцирующие рекомбинантные ферменты Egh12, Xgh12b и катепсин L, обеспечивают более высокий уровень синтеза ферментов по сравнению с аналогичными штаммами *K. phaffii*. Одновременно с увеличением скорости усвоения сорбитола дрожжи *K. kurtzmanii* ускоряют рост и снижают удельный синтез целевых белков, что, тем не менее, позволяет на 15-30% увеличить уровень продукции рекомбинантной эндоглюканазы Egh12 за счет оптимизации соотношения метанола и сорбитола в среде.
6. Показано, что культивирование модифицированного штамма дрожжей *K. kurtzmanii* в биореакторе с использованием в составе подпитки 12,5% сорбитола обеспечивает прирост биомассы и двукратный рост удельных показателей синтеза эндоглюканазы Egh12, что в сумме приводит к 2,5-кратному увеличению продукции белка.

## Список публикаций по теме диссертации

### Публикации в научных журналах:

- 1) **Ф.И. Акентьев**, Д.Д. Соколова, И.И. Губайдуллин, С.В. Рыков, О.В. Березина, Н.О. Черноморова, Е.Н. Элпидина, Д.Г. Козлов. Увеличение скорости метаболизма сорбитола негативно влияет на метанол-индуцируемый синтез рекомбинантных ферментов в дрожжах *Komagataella kurtzmanii* и *Komagataella phaffii*. *Биотехнология*, 2024, 40(1):3-14. doi: 10.56304/S0234275824010022.
- 2) **Akentyev P**, Sokolova D, Korzhenkov A, Gubaidullin I, Kozlov D. Expression level of SOR1 is a bottleneck for efficient sorbitol utilization by yeast *Komagataella kurtzmanii*. *Yeast*, 2023, 40(9):414-424. doi: 10.1002/yea.3884.
- 3) Serkina AV, Gubaidullin II, **Akentyev PI**, Dombrovskii IA, Filippova IYu, Elpidina EN, Kozlov DG, Bulushova NV. Development of the Fundamentals of a Technology for the Production of *Tribolium castaneum* Recombinant Cathepsin L in *Komagataella kurtzmanii* Yeast. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2023, 59(8):1078-1088. doi: 10.1134/S0003683823080082.
- 4) Rykov SV, Selimzyanova AI, Nikolaeva AY, Lazarenko VA, Tsurin NV, **Akentyev PI**, Zverlov VV, Liebl W, Schwarz WH, Berezina OV. Unusual substrate specificity in GH family 12: structure-function analysis of glucanases Bgh12A and Xgh12B from *Aspergillus cervinus*, and Egh12 from *Thielavia terrestris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(4):1493-1509. doi: 10.1007/s00253-022-11811-7. Epub 2022 Feb 7.

### Патенты:

- 1) **Акентьев Ф.И.**, Соколова Д.Д., Губайдуллин И.И., Козлов Д.Г. Патент RU 2814987 от 11.03.2024 (заявка №2023117728 от 05.07.2023). Способ получения дрожжей *K. kurtzmanii* с улучшенной способностью к усвоению сорбитола.

### Тезисы конференций:

- 1) Соколова Д.Д., **Акентьев Ф.И.**, Губайдуллин И.И., Козлов Д.Г. Экспрессия SOR1 является лимитирующей стадией метаболизма сорбитола у дрожжей *Komagataella kurtzmanii*. 27 февраля – 4 марта 2023 года, XXII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии, Гатчина, Россия.
- 2) Калабанова Д.Д., **Акентьев Ф.И.**, Губайдуллин И.И., Козлов Д.Г. Исследование генетических особенностей дрожжей *Komagataella kurtzmanii*, определяющих способность к утилизации сорбитола. 18–22 апреля 2022 года, 25-ая Пушкинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века», Пушкино, Россия.
- 3) Березина О.В., Рыков С.В., **Акентьев Ф.И.**, Завьялов А.В., Полякова А.К., Яроцкий С.В. Дизайн штаммов, продуцирующих новые карбогидразы, и перспективы использования рекомбинантных ферментов в кормопроизводстве. 16-19 апреля 2019 года, XVI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием "Пищевые технологии и биотехнологии", Казань, Россия.
- 4) **Акентьев Ф.И.**, Черноморова Н.О., Серкина А.В., Полякова А.К., Рыков С.В., Березина О.В. Гетерологичный синтез ксилоглюканазы Xgh12B из *Aspergillus cervinus* в высокопродуктивном штамме *Pichia pastoris* и очистка рекомбинантного белка. 25 февраля – 2 марта 2019 года, Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, Гатчина, Россия.