

*На правах рукописи*



**Таратынова Мария Олеговна**

**Метаболическая инженерия дрожжей *Yarrowia lipolytica*,  
направленная на разработку синтеза соединений  
терпенового ряда**

Специальность: 1.5.7. – Генетика

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

Москва – 2024

Работа выполнена в Биоресурсном центре – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Курчатова комплекса НБИКС-природоподобных технологий (КК НБИКС-пт) НИЦ «Курчатовский институт».

**Научный руководитель:** **Синеокий Сергей Павлович**  
доктор биологических наук, профессор,  
руководитель Биоресурсного центра –  
Всероссийская коллекция промышленных  
микроорганизмов КК НБИКС-пт  
НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва.

**Официальные оппоненты:** **Машко Сергей Владимирович**  
доктор биологических наук, консультант по  
научной работе Акционерного общества  
«Научно-исследовательский институт  
Аджиномото-Генетика», г. Москва;

**Карпов Дмитрий Сергеевич**  
кандидат биологических наук, ведущий  
научный сотрудник Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
науки «Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта» Российской академии  
наук, г. Москва.

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

Защита диссертации состоится 20 июня 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 работы

Терпеноиды, также известные как изопреноиды, представляют собой обширное семейство, насчитывающее более 80000 различных соединений (Zhang *et al.*, 2020a). В природе терпены и терпеноиды составляют самый многочисленный класс среди вторичных метаболитов растений, а также являются вторичными метаболитами микроорганизмов и беспозвоночных. Они обнаружены почти во всех тканях растений (часто в виде эфирных масел) и в продуктах жизнедеятельности некоторых бактерий и грибов. Соединения терпенового ряда относятся к наиболее биологически значимым классам природных продуктов, обладающих разнообразной биологической активностью, в связи с чем они находят применение в фармацевтике, медицине, кормовой и пищевой промышленности, агрохимии, парфюмерии, биотопливной промышленности и многих других областях.

Среди терпеноидов в качестве перспективных для промышленности веществ можно выделить астаксантин,  $\beta$ -каротин и линалоол. Данные соединения в основном получают методом химического синтеза или экстракцией из растительного сырья. Вместе с тем, остается необходимым изыскание более эффективных способов получения данных терпеноидов, так как экстракция является дорогостоящим процессом, а химический синтез часто не отвечает требованиям безопасности и пригодности использования продукта для живых существ, а также зачастую встает проблема стереоселективности производства. Для решения данных проблем можно использовать успехи в области метаболической инженерии микроорганизмов, получая необходимое вещество с заданными свойствами.

Начиная с описания первой изолированной культуры дрожжей *Yarrowia lipolytica* в 1945 году (Barth, Gaillardin, 1997) происходило постепенное их изучение, которое в последствии привело к тому, что дрожжи *Y. lipolytica* стали привлекательным организмом-хозяином для производства разнообразных липидных и нелипидных химических веществ (Miller, Alper, 2019). В научном сообществе *Y. lipolytica* рассматриваются как перспективный микроорганизм для продукции веществ терпенового ряда (Arnesen *et al.*, 2020). *Y. lipolytica* – безопасный и хорошо изученный реципиент, способный к высокому уровню экспрессии ферментов и биосинтеза ацетил-КоА, стартового вещества пути синтеза соединений терпенового ряда.

Исходя из этого, была поставлена задача, заключающаяся в создании эффективного метаболического пути синтеза терпеноидов с использованием микроорганизмов. В качестве перспективного объекта были выбраны дрожжи *Y. lipolytica*, а в качестве модельных веществ – астаксантин,  $\beta$ -каротин и линалоол.

### Цели и задачи работы

Целью данной работы являлось создание эффективного метаболического пути синтеза терпеноидов на платформе дрожжей *Yarrowia lipolytica*.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Совершенствование системы редактирования генома *Y. lipolytica*.
2. Метаболическая инженерия, направленная на введение пути биосинтеза монотерпена линалоола в дрожжах *Y. lipolytica*.
3. Метаболическая инженерия, направленная на введение пути биосинтеза ценных каротиноидов  $\beta$ -каротина и астаксантина в дрожжах *Y. lipolytica*.
4. Конструирование штаммов-продуцентов соединений терпенового ряда:  $\beta$ -каротина, астаксантина и линалоола.

#### **Научная новизна**

Описан новый промотор pAraDH2 гена *AraDH2* *Y. lipolytica*, кодирующего D-арабитолдегидрогеназу.

Разработаны варианты генетических модификаций для эффективного синтеза терпеноидов линалоола,  $\beta$ -каротина и астаксантина на платформе *Y. lipolytica*.

Впервые показана эффективность экспрессии гетерологичного гена *CrGPPS* *Catharanthus roseus*, кодирующего геранилдифосфатсинтазу, для получения линалоола на *Y. lipolytica*.

Продемонстрирована эффективность экспрессии слитых генов линалоолсинтазы *AaLIS* *Actinidia arguta* и *CrGPPS* для синтеза линалоола, а также слитых генов, кодирующих фитоенсинтазу и геранилгеранилдифосфатсинтазу для синтеза каротиноидов штаммами *Y. lipolytica*.

Впервые описано образование кристаллов  $\beta$ -каротина при достижении высоких уровней его накопления в клетках *Y. lipolytica*.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Линалоол используется как ароматизатор и консервант, входящий в состав косметических средств. Он общепризнан Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) как безопасный ароматизатор (Haque *et al.*, 2021). Линалоол может использоваться как антибактериальное, противовоспалительное и противогрибковое средство (Abd El-Baky *et al.*, 2016).

$\beta$ -каротин является предшественником витамина А и одобрен FDA для использования в качестве пищевой добавки (Grenfell-Lee *et al.*, 2014), а также для добавления в детские смеси в качестве источника витамина А. Помимо этого,  $\beta$ -каротин обладает сильными антиоксидантными свойствами и широко используется в косметической, медицинской, пищевой и кормовой промышленности.

Астаксантин используется в косметике и продуктах питания в связи с высокой антиоксидантной активностью, а также в кормовых целях, например, для улучшения цвета мяса выращиваемой рыбы и увеличения пигментации яичных желтков. Также астаксантин может применяться в медицинских целях в связи с значительными антиоксидантными, противовоспалительными, антипролиферативными и антиапоптотическими свойствами (Kohandel *et al.*, 2022).

Астаксантин и  $\beta$ -каротин, полученные химическим путем посредством двойной реакции Виттига, могут содержать примеси токсичных промежуточных и побочных продуктов, обладающие канцерогенной активностью (Siahaan *et al.* 2021; Bogacz-Radomska *et al.* 2018). Химический синтез монотерпенов – это сложный многостадийный процесс, поскольку продукты имеют хиральную структуру с чувствительными к температуре химическими связями, низкими температурами кипения и высоким давлением паров (Kamatou *et al.* 2008). К недостаткам способа получения  $\beta$ -каротина и линалоола путем экстракции из растительного сырья следует отнести высокую себестоимость, низкую конечную концентрацию, сезонность сбора растений, а также потенциальную примесь пестицидов и микотоксинов. Извлечение астаксантина из природных источников является значительно более дорогим и менее эффективным процессом, чем химический синтез.

Для получения продуцентов терпеноидов микробиологическим путем необходима экспрессия значительного количества генов. В связи с этим разработка эффективной системы редактирования генома является актуальной задачей. В данной работе были выявлены 17 новых хромосомальных локусов для интеграции экспрессионных кассет в геном дрожжей *Y. lipolytica* с помощью CRISPR-Cas9 системы. Для каждого локуса были подобраны высокоэффективные сайты узнавания эндонуклеазы Cas9. В настоящей работе демонстрируется способ конструирования экспрессионных векторов с помощью метода Гиббона, позволяющий объединять до трех транскрипционных единиц, которые в последствии могут быть интегрированы в геном *Y. lipolytica*. В дополнение к этому, в работе использовался разработанный нашей исследовательской группой упрощенный и ускоренный способ изменения последовательности gRNA на Cas9-вспомогательных плаزمидках, позволяющий полностью обойти сложные этапы клонирования *in vitro*, применяемые в других методиках, описанных в литературе (Yuzbashev *et al.*, 2022). В данной работе описан метод инактивации генов *Y. lipolytica* с использованием системы редактирования генома CRISPR-Cas9 и коротких линейных фрагментов ДНК длиной 120 нуклеотидов в качестве матрицы для репарации. В связи с тем, что в описанном методе нет необходимости получать матрицу для репарации в составе плазмидного вектора, возможно снизить время- и трудозатраты на подготовку матрицы.

Получен штамм ВКПМ Y-5110 *Y. lipolytica*, накапливающий в колбах 109,6 мг/л линалоола, что в 16 раз выше значений, описанных в литературе для *Y. lipolytica*.

В результате проведенных исследований получен штамм *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4950, продуцирующий 2,4 г/л (38 мг/г сухого веса)  $\beta$ -каротина за 89 часов культивирования в 3-л биореакторе.

Получен штамм *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4871 - продуцент астаксантина. Для данного штамма разработана схема культивирования, которая приводила к наиболее эффективному преобразованию глюкозы в астаксантин с выходом 2,8 мг

астаксантина/г глюкозы, что соответствует 357,1 г глюкозы/г астаксантина. Также при культивировании в биореакторе исследована экстракция *in situ* в верхнем слое масла, анализ которого показал присутствие астаксантина без примеси других каротиноидов. При этом суммарно титр астаксантина оценивался в 973,4 мг/л на 168 час культивирования. Проведено крупномасштабное культивирование штамма-продуцента астаксантина в 100-л биореакторе с глицерином в качестве источника углерода. Титр астаксантина на 114 час культивирования составил 812,3 мг/л (12,9 мг/г сухого веса), что представляет собой самое высокое содержание астаксантина, зарегистрированное на текущий момент при крупномасштабном культивировании.

Разработанная в данном исследовании стратегия метаболической инженерии, примененная при конструировании штаммов продуцентов каротиноидов, легла в основу дальнейшего конструирования штаммов суперпродуцентов следующих поколений (выходящих за рамки данной работы).

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Использование промотора *pAraDH2* дрожжей *Y. lipolytica* для экспрессии гетерологичных генов эффективно при конструировании штамма, продуцирующего  $\beta$ -каротин.
2. Экспрессия гена *CrGPPS Catharanthus roseus* и слитых генов *fusCrGPPS-AaLIS* и *fusAaLIS-CrGPPS* при конструировании продуцента линалоола позволяет значительно повысить уровень синтеза линалоола рекомбинантными штаммами дрожжей *Y. lipolytica*.
3. Получен рекомбинантный штамм продуцент линалоола *Y. lipolytica* ВКПМ Y-5110, существенно превосходящий по продуктивности описанные в литературе продуценты на основе *Y. lipolytica*.
4. Экспрессия слитых генов *fusCarRP-GGPPs7* и *fusCarRP-ERG20<sup>F88C</sup>* при конструировании рекомбинантных продуцентов  $\beta$ -каротина или астаксантина на дрожжах *Y. lipolytica* значительно повышает продукцию  $\beta$ -каротина и астаксантина, соответственно.
5. Получен рекомбинантный штамм продуцент астаксантина *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4871, который является эффективным для крупномасштабного биотехнологического производства.
6. При культивировании полученного штамма *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4950 в 3-х литровом биореакторе впервые на дрожжах зарегистрировано внутриклеточное образование кристаллов  $\beta$ -каротина.

**Вклад автора.** Работа выполнена автором лично. Основная часть материалов для проведения исследования получена автором самостоятельно.

**Апробация работы.** Диссертационная работа была изложена на международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и

практика» (Севастополь, Россия, 2019); на «3-ем российском микробиологическом конгрессе» (Псков, Россия, 2021) и на тематическом семинаре Курчатовского комплекса НБИКС-ПТ «Биотехнология и биоэнергетика» (Москва, Россия, 2023).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано пять работ в рецензируемых российских и зарубежных журналах, входящих в список ВАК, а также два патента.

### **Структура и объём работы**

Настоящая работа включает оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы из 187 источников, список иллюстративного материала, приложение. Диссертация изложена на 149 страницах, содержит 32 рисунка и 12 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Введение.** Во введении диссертационной работы обоснована актуальность темы исследования, описана научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту.

**Обзор литературы** включает характеристику дрожжей *Y. lipolytica*, потребляемые *Y. lipolytica* источники углерода и генетический инструментарий для работы с *Y. lipolytica*. Приведены основные подходы к метаболической инженерии *Y. lipolytica* с целью получения биосинтетическим путем терпенов и терпеноидов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Штаммы и среды**

Штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F' proAB lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10*]) использовали для клонирования и поддержания плазмид. Клетки растили при 37°C с аэрацией в 5 мл среды LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта и 10 г/л NaCl). Штамм *E. coli* EcoRed (*F' ilvG<sup>-</sup> rfb-50 rph-1 λ* [*cI<sup>857</sup>Δ(cro-attR)*] *rpsL<sup>K43R</sup>*) (Yuzbashev *et al.*, 2022) использовали для клонирования и поддержания плазмид pCasNA-Int. Клетки EcoRed растили при 30°C с аэрацией в 5 мл среды LB. При необходимости добавляли ампициллин (100 мкг/мл), хлорамфеникол (20 мкг/мл) или спектиномицин (50 мкг/мл).

Штамм *Y. lipolytica* дикого типа W29 (ATCC 20460) был использован в качестве родительского штамма для всех штаммов, полученных в данной работе. Штаммы выращивали при 30 °C на минимальных средах YNB, Himedia G091 — 0.67% yeast nitrogen base (Difco, США) или на полноценных средах YP (пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л) с добавлением необходимого источника углерода. При необходимости в среду добавляли ноурсеотрицин (Nat) в концентрации 250 мкг/мл или гигромицин в

концентрации 450 мкг/мл или урацил 150 мкг/мл. Твердые среды для *E. coli* и *Y. lipolytica* готовили путем добавления 20 г/л агара.

### Конструирование штаммов

Все сконструированные плазмиды были собраны с использованием общих стратегий клонирования (Green, 2012), сборки Гибсона (Gibson *et al.*, 2009) и рекомбинации *E. coli* (Yuzbashev *et al.*, 2022).

Штаммы *Y. lipolytica* были сконструированы с помощью безмаркерной системы редактирования CRISPR-Cas9. Направляющая (sgRNA) и Cas9 экспрессировались из эписомальной плазмиды pCasNA-серии (Yuzbashev *et al.*, 2022), которая была ко-трансформирована с кассетой репарации, содержащей единицу транскрипции, фланкированную гомологичными целевому хромосомному региону плечами. Штаммы дрожжей трансформировали методом ацетата лития (Yuzbashev *et al.*, 2022).

### Методы анализа

Результаты культивирования анализировались с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также газовой хроматографией, совмещенной с масс-спектрометрией. В работе был использован флуоресцентный анализ и анализ кинетики роста клеток. Анализ культуральной жидкости был проведен методом микроскопии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Совершенствование системы редактирования генома дрожжей *Yarrowia lipolytica*

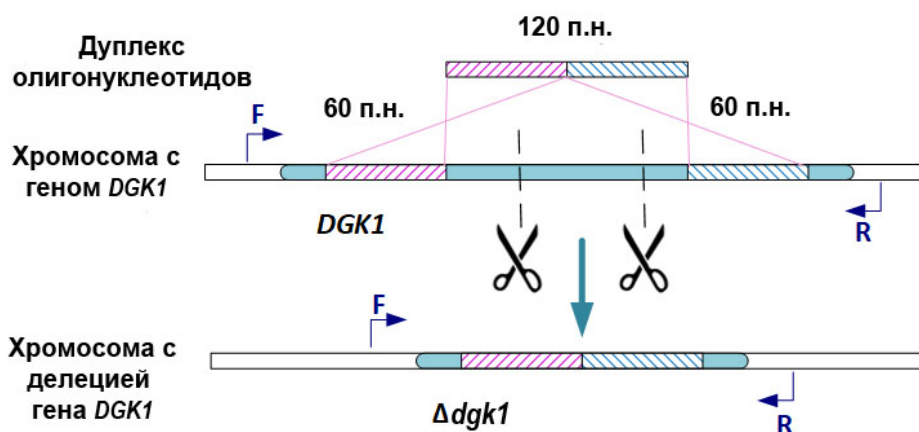
#### *Внесение делеций с помощью CRISPR-Cas9 системы редактирования генома дрожжей Yarrowia lipolytica*

*Y. lipolytica* при внесении двуцепочечного разрыва ДНК характеризуется высокой эффективностью негомологичной рекомбинации и относительно низкой эффективностью гомологичной рекомбинации. Эта особенность осложняет работу с системой CRISPR-Cas9 на данном объекте. В литературе описано две стратегии повышения частоты и эффективности гомологичной рекомбинации у *Y. lipolytica*: инактивация гена *KU70*, контролирующего репарацию двуцепочечного разрыва путем негомологичной рекомбинации (Verbeke *et al.*, 2013); а также экспрессия гена *RAD52* *S. cerevisiae*, ключевого компонента, ответственного за гомологичную рекомбинацию (Ji *et al.*, 2020).

Оценка эффективности использования двух вышеописанных стратегий была проведена на примере опосредованной CRISPR-Cas9 инактивации генов *DGK1* и *PHI1*, кодирующих диацилглицеролкиназу и фосфатидатфосфатазу, соответственно (рис. 1). В обоих случаях клетки трансформировали двумя различными вспомогательными плазмидами, каждая из которых несла последовательность sgRNA, комплиментарную области внутри целевого гена как показано на рисунке 1. В качестве матрицы для репарации разрыва использовали фрагменты ДНК длиной 120 п.н., полученные путем отжига двух взаимокплиментарных синтетических



олигонуклеотидов. Наличие ожидаемых делеций подтверждали с помощью ПЦР с использованием шести колоний трансформантов для каждого эксперимента.



**Рис. 1.** Схема CRISPR-Cas9 опосредованной инактивации гена *DGK1* путем внесения двуцепочечных разрывов (места разрывов показаны пунктиром с ножницами) и вставке дуплекса олигонуклеотидов (длиной 120 п.н.), гомологичного участку на хромосоме. Места отжига праймеров показаны как F и R.

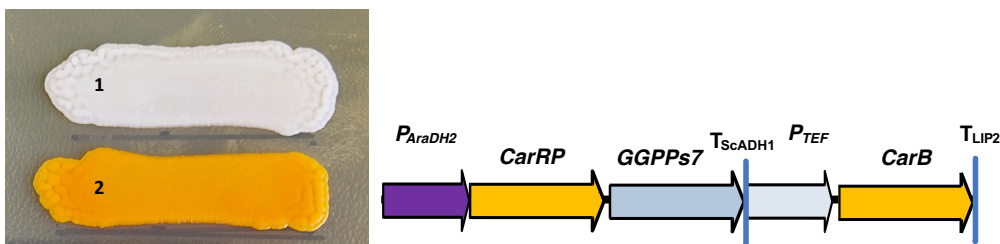
Инактивация гена *DGK1* с использованием в качестве матрицы для репарации дуплекса олигонуклеотидов длиной 120 п.н. оказалось более эффективной (W29  $\Delta ku70$  – 100 %, 6 из 6 проверенных трансформантов; W29 *RAD52* – 67 %, 4 из 6), по сравнению с инактивацией *PAH1* (W29  $\Delta ku70$  – 50 %, 3 из 6; W29 *RAD52* – 17 %, 1 из 6). В целом, при использовании стратегии  $\Delta ku70$  эффективность инактивации была выше, чем при экспрессии *RAD52*, в связи с чем конструирование продуцентов терпенового ряда проводилось на штамме с мутацией  $\Delta ku70$ .

#### *Интеграция генов с помощью системы редактирования генома Y. lipolytica на основе CRISPR-Cas9*

Используя выбранную стратегию инактивации гена *KU70*, удалось встроить 30 интеграционных кассет размером от 2970 до 8287 п.н. в 17 локусов генома *Y. lipolytica*. В частности, в 70% экспериментов (21 из 30) эффективность интеграции конструкций составляла более 80%. Оставшиеся сайты-мишени в локусах IntA2, A4, E6 и F11 характеризовались эффективностью интеграции от 17 до 40 %. Таким образом, разработанная система позволила успешно получать рекомбинантные штаммы, несущие гетерологичные конструкции в целевых геномных локусах.

#### *Новый промотор дрожжей Y. lipolytica и его применение при конструировании штамма, продуцирующего $\beta$ -каротин*

Изучение промоторной области гена *AraDH2* *Y. lipolytica*, кодирующего D-арабитолдегидрогеназу было осуществлено с использованием гена зеленого флуоресцентного белка *hrGFP Renilla*.



**Рис. 2.** Слева: биомасса исходного штамма ВКПМ Y-4967 (1) и штамма-производителя  $\beta$ -каротина ВКПМ Y-5032 (2) на богатой агаризованной среде YP с 20 г/л сахарозы. Справа: схема конструкции, интегрированной в геном штамма ВКПМ Y-4967 с получением штамма ВКПМ Y-5032. Слитые гены *CarRP-GGPPs7* находятся под контролем промотора *pAraDH2*, ген *CarB* под контролем промотора *pTEF*.

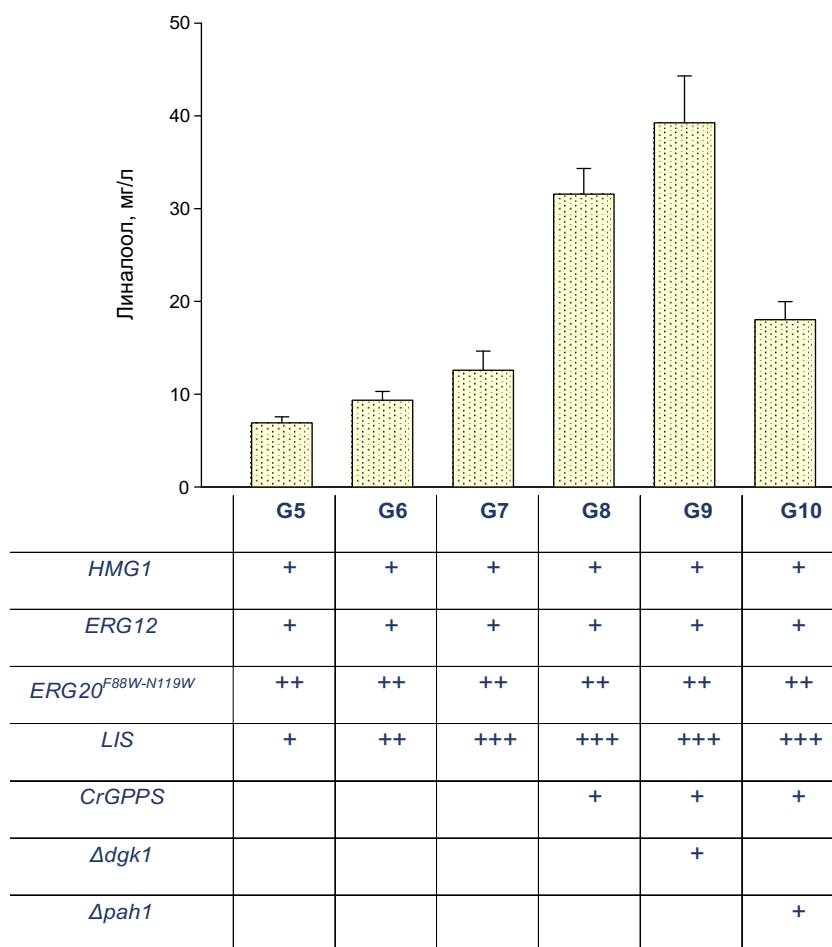
Была продемонстрирована возможность использования промотора *pAraDH2* в задачах метаболической инженерии на примере создания штамма *Y. lipolytica* - производителя  $\beta$ -каротина. Для этого в штамм ВКПМ Y-4967 с генотипом W29 ( $\Delta$ *pex10*  $\Delta$ *ku70::URA3 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1*), была интегрирована конструкция, в которой слитые гены *fusCarRP-GGPPs7* (где ген *CarRP* *Mucor circinelloides*, кодирующий бифункциональные ферменты фитоенсинтазу/ликопин- $\beta$ -циклазу был слит через свой С-концевой участок с геном *GGPPs7* *Synechococcus* sp., кодирующим геранилгеранилдифосфатсинтазу) находились под контролем промотора *pAraDH2*, а ген *CarB* был помещен под контроль промотора *pTEF* (рис. 2). Полученный штамм ВКПМ Y-5032 культивировали в питательной среде YP с добавлением разных источников углерода: сахарозы (90 г/л), глицерина (90 г/л) или глюкозы (90 г/л). Лучшие результаты были достигнуты с использованием питательной среды с глюкозой, где уровень накопления  $\beta$ -каротина составил 148,9 мг/л (или 6,3 мг/г сухого веса)  $\beta$ -каротина.

### Метаболическая инженерия, направленная на введение пути синтеза монотерпена линалоола в дрожжах *Y. lipolytica*

В работе по конструированию производителя линалоола в качестве родительского использовали штамм ВКПМ Y-4620 с генотипом W29 ( $\Delta$ *pex10*  $\Delta$ *ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1*). В нем были последовательно сверхэкспрессированы гены *HMG1*, *ERG12* и две копии гена *ERG20<sup>F88W-N119W</sup>*, кодирующих 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу, мевалонаткиназу и мутантный вариант фарнезилдифосфатсинтазы, соответственно. Увеличение количества копий гена *AaLIS* *Actinida argute*, кодирующего (S)-линалоолсинтазу, привело к повышению накопления линалоола с 6,9 мг/л для одной копии до 12,6 мг/л для трех копий (рис. 3). Часто низкий уровень продукции монотерпенов может быть связан с недостаточным синтезом прекурсоров (Zhang *et al.*, 2020d). Поэтому, для дальнейшего увеличения уровня накопления линалоола в штамм G7 был введен укороченный аллель *CrGPPS* *Catharanthus roseus* (Met<sub>100</sub>-CrGPPS), кодирующий

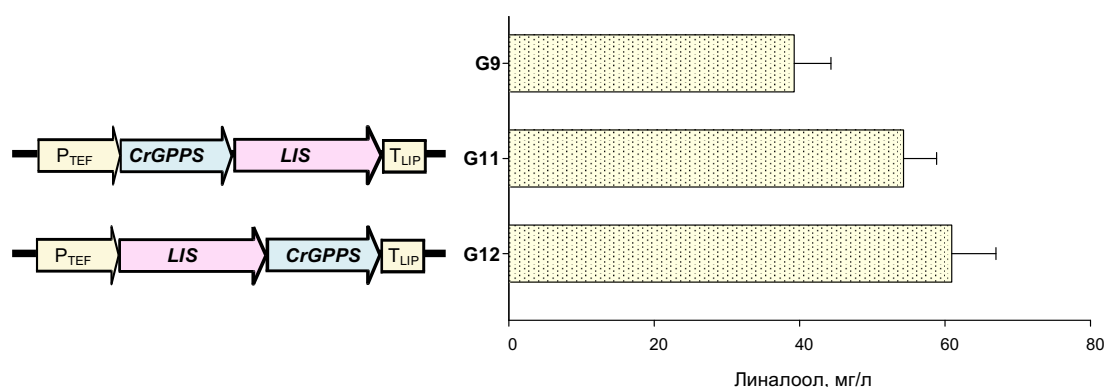
геранилдифосфатсинтазу, в результате чего был получен штамм G8. Действительно, штамм G8, экспрессирующий *CrGPPS*, демонстрировал 2,5-кратное увеличение титра линалоола (31,6 мг/л) по сравнению с родительским штаммом G7 (рис. 3).

В литературе описано, что в этом случае совместная делеция генов *DGK1* и *PAH1*, кодирующих диацилглицеролкиназу и фосфатидатфосфатазу, соответственно, способна увеличить выход терпеноида. В данном исследовании делеция гена *PAH1* в штамме G8 (результатирующий штамм G10, рис. 3), приводила к снижению росту (9,1 г сухого веса/л), а также к уменьшению титра линалоола в 1,8 раза (18,0 мг/л). Напротив, инактивация гена *DGK1* в штамме G8 (с получением штамма G9) повышала продукцию линалоола в 1,2 раза (39,3 мг/л) по сравнению с родительским штаммом.



**Рис. 3.** Продукция линалоола сконструированными штаммами дрожжей *Y. lipolytica* при двухфазном культивировании в колбах. Клетки культивировали в богатой среде YP с сахарозой (90 г/л) в течение 5 дней, на 3-е сутки был добавлен изопропилмиририкат. Штамм из каждого столбца охарактеризован наличием генов из соответствующих строк с помощью обозначения «+» (один «+» подразумевает введение одной копии гена). Столбики ошибок указывают на стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов.

Одним из способов увеличения активности отдельных последовательных реакций метаболических путей является слияние двух или более генов между собой через короткую линкерную последовательность. Это позволяет добиться прямого перемещения продуктов первой реакции в реакционный центр фермента, катализирующего следующую стадию синтеза, и избежать свободной диффузии интермедиатов в цитозоле, что, в свою очередь, способствует локальному повышению их концентрации и предотвращает их возможные токсические эффекты (Woolston *et al.*, 2013). В данной работе гены *AaLIS* и *CrGPPS* были слиты через последовательность, кодирующую гибкий линкер Gly-Gly-Gly-Ser. Полученную последовательность интегрировали в геном лучшего штамма G9 (рис. 4). Оба штамма, G11 (экспрессирующий гибридный фермент, где *CrGPPS* был слит через свой С-концевой участок с *AaLIS*; *fusCrGPPS-AaLIS*) и G12 (экспрессирующий гибридный фермент, где *AaLIS* был слит через свой С-концевой участок с *CrGPPS*; *fusAaLIS-CrGPPS*) продемонстрировали повышение продукции линалоола по сравнению с родительским штаммом G9 (рис. 4). Штамм G12, показавший наилучшие результаты, накапливал 60,9 мг/л линалоола в колбах на 5 сутки культивирования.



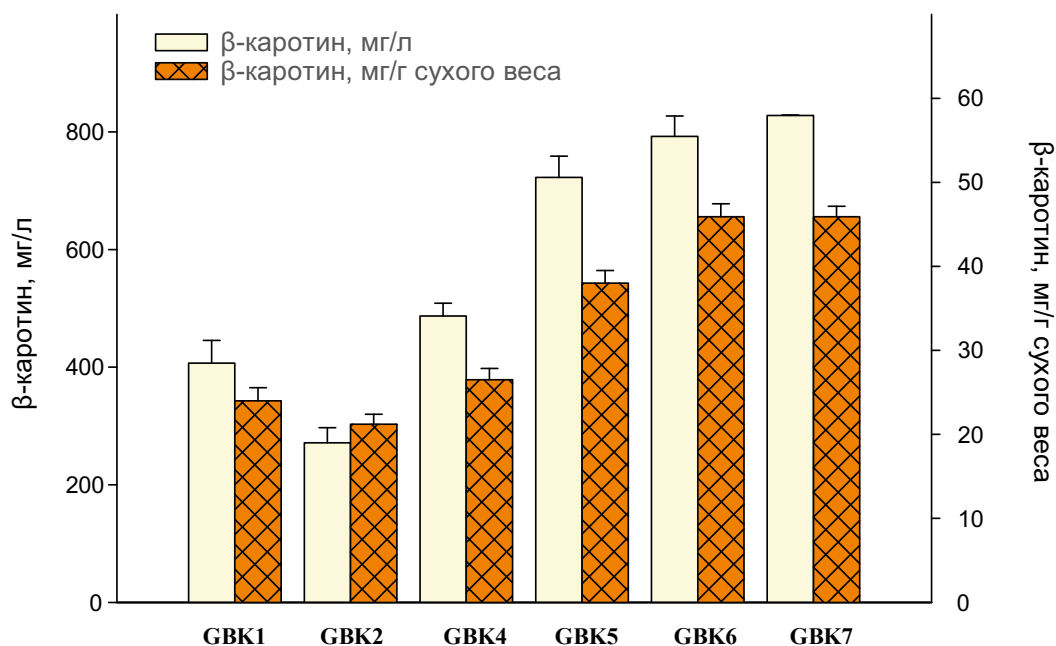
**Рис. 4.** Схема конструкций, содержащих гены *AaLIS* и *CrGPPS*, слитые между собой через последовательность, кодирующую гибкий линкер Gly-Gly-Gly-Ser (слева). Продукция линалоола сконструированными штаммами *Y. lipolytica* при двухфазном культивировании в колбах (справа). Клетки культивировали в богатой среде с сахарозой (90 г/л) в качестве источника углерода в течение 5 дней, на 3-е сутки был добавлен изопропилмиристат. Показаны средние значения трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

Накопление линалоола полученным штаммом G12 (ВКПМ Y-5110) оценивали в течение 7 дневного двухфазного культивирования в колбах в богатой среде YP с 90 г/л сахарозы и добавлением на третий день изопропилмиристата. Биомасса (г сухого веса/л) росла на протяжении всего культивирования. Накопление линалоола оценивали, начиная с 72-ого часа культивирования. На 7 день содержание линалоола достигло 109,6 мг/л, что является наивысшим значением, полученным на дрожжах *Y. lipolytica*.

## Разработка метаболического пути биосинтеза ценных каротиноидов $\beta$ -каротина и астаксантина в дрожжах *Y. lipolytica*

Конструирование штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica* - продуцента  $\beta$ -каротина

В целях получения продукции  $\beta$ -каротина в штамм *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4620 интегрировали гетерологичные гены *CarRP* и *CarB* *M. circinelloides*, а также ген *GGS1* *Y. lipolytica*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу (рис. 5) с получением штамма GBK1.

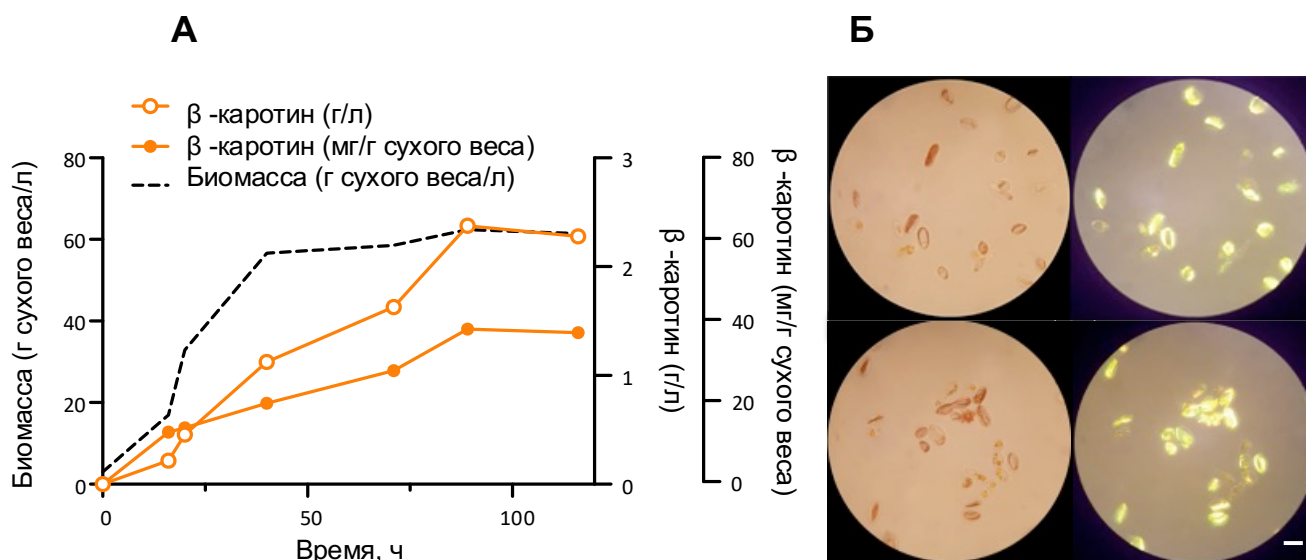


<i>CarB</i> <i>CarRP</i> <i>GGS1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>HMG1</i>		+	+	+	+	+
<i>ERG12</i> <i>ERG20</i>			+	+	+	+
<i>fusCarRP</i> - <i>GGPPs7</i>				+	+	+
<i>fusCarRP</i> - <i>ERG20<sup>F88C</sup></i>					+	+
<i>CarB</i>						+

**Рис. 5.** Продукция  $\beta$ -каротина сконструированными штаммами дрожжей *Y. lipolytica*. Клетки культивировали в среде YP с сахарозой в качестве источника углерода в пробирках в течение 5 дней. Столбики ошибок указывают на стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов. Штамм из каждого столбца охарактеризован наличием генов из соответствующих строк с помощью обозначения «+» (один «+» подразумевает введение одной копии гена).

Далее, в штамме GBK1 было увеличено количество предшественников, доступных для синтеза каротиноидов, путем введения дополнительной копии каждого из следующих нативных генов, кодирующих 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу (*Hmg1*), мевалонаткиназу (*Erg12*) и

фарнезилдифосфатсинтазу (*Erg20*). В наибольшей степени на накопление  $\beta$ -каротина повлияло введение в геном штамма GBK4 слитых генов *fusCarRP-GGPPs7* (где *CarRP* был слит через свой С-концевой участок гибким линкером Gly-Gly-Gly-Ser с *GGPPs7*), что увеличило продукцию на 43% с 26,5 мг/г сухого веса (GBK4) до 38,0 мг/г сухого веса (GBK5). В полученный штамм была введена дополнительная копия гена *CarRP*, слитая через свой С-концевой участок с *ERG20<sup>F88C</sup>*, кодирующей мутантный аллель *ERG20<sup>F88C</sup>* *Y. lipolytica*, которая сдвигает активность фермента в сторону образования GGPP (Arnesen *et al.*, 2020). Полученный штамм был назван GBK6. Введение слитых генов *fusCarRP-ERG20<sup>F88C</sup>* привело к повышению накопления  $\beta$ -каротина клетками до 45,4 мг/г сухого веса (штамм GBK6), что на 19% выше, чем в родительском штамме GBK5. Последующей экспрессией гена *CarB* был получен штамм GBK7, который продуцировал 45,4 мг/г сухого веса и 828,0 мг/л  $\beta$ -каротина (рис. 5). Данная модификация оказала влияние на увеличение накопления биомассы штаммом с 17,2 (GBK6) до 18,0 г сухого веса/л (GBK7).



**Рис. 6.** А – результаты культивирования штамма GBK7 в 3 л биореакторе, показана динамика изменения титра  $\beta$ -каротина и количества биомассы. Б – Оптическая световая микроскопия (слева) и поляризационная световая микроскопия (справа) культуры штамма GBK7, демонстрирующая образование кристаллов  $\beta$ -каротина, имеющих характерный оранжевый цвет. Масштабная линейка составляет 5 мкм.

Полученный штамм ВКПМ Y4950 культивировали в 3 л биореакторе с глюкозой в качестве источника углерода. Продукция  $\beta$ -каротина штаммом ВКПМ Y4950 к 89 часу составила 38 мг/г сухого веса (2,38 г/л) (рис. 6А). При этом накопление биомассы составило 62,5 г сухого веса клетки/л. Интересно отметить также, что при культивировании в биореакторе было замечено внутриклеточное образование кристаллов  $\beta$ -каротина с помощью микроскопии в поляризованном свете (рис. 6Б). Это первое описание получения кристаллов  $\beta$ -каротина на дрожжах.

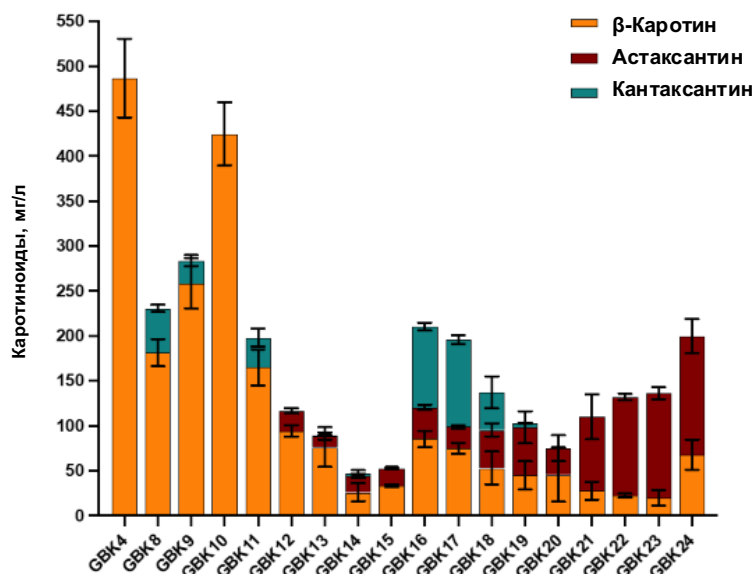
### Создание штамма дрожжей *Y. lipolytica*, синтезирующего астаксантин

Для создания продуцента астаксантина было исследовано влияние различных гетерологичных  $\beta$ -каротинкетолаз (*HpBKT* из *Haematococcus pluvialis*; *BvcrtW* из *Brevundimonas vesicularis* и *AspcrtW* из *Alcaligenes* sp.) и  $\beta$ -каротингидроксилаз (*HpCrtZ* из *H. pluvialis* и *AacrtZ* из *Agrobacterium aurantiacum*) в полученном ранее штамме GBK4 (рис. 6). Наилучшие результаты были получены со штаммом, экспрессирующим сочетание  $\beta$ -каротинкетолазы и  $\beta$ -каротингидроксилазы из *H. pluvialis* (рис. 6, штамм GBK12). *AspcrtW* и *AacrtZ* оказались нефункциональны в клетках *Y. lipolytica* (рис. 6, штаммы GBK10 и GBK11, соответственно).

Затем, для уменьшения накопления промежуточных продуктов, таких как кантаксантин, зеаксантин, ехиненон и др. (Martin *et al.*, 2008), и увеличения потока углерода от  $\beta$ -каротина к астаксантину были протестировали варианты слияния генов *HpBKT* и *HpCrtZ* (рис. 7). Ранее было показано, что гибридный фермент, полученный в результате слияния *HpBKT* через свой С-концевой участок с *HpCrtZ* с помощью линкера Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Pro-Gly-Ser, позволяет клеткам накапливать больше астаксантина по сравнению с другими вариантами слитых белков (Ma *et al.*, 2021a). Тем не менее, в данной работе несколько более высокий титр астаксантина наблюдался при использовании конструкций с отдельными *HpBKT* и *HpCrtZ*. Этот штамм (GBK12) по продукции превосходил штаммы (GBK13 и GBK15), несущие лучшую слитую конструкцию *fusHpCrtZ-HpBKT* в локусе IntE6 или IntF11, соответственно (рис. 7). Таким образом, различия между штаммами, содержащими отдельные гены *HpBKT* и *HpCrtZ* и данные гены в составе слитых конструкций вряд ли может быть связано с эффектом положения в геноме. Поэтому для дальнейшего конструирования была выбрана стратегия с интеграцией трех отдельных копий *HpBKT* и *HpCrtZ* в геном штамма GBK4. Полученный штамм GBK19 при культивировании в пробирках накапливал 45,1 мг/л  $\beta$ -каротина и 53,3 мг/л астаксантина, соответственно (рис. 7).

Последующее увеличение накопления астаксантина было основано на повышении количества доступных метаболитов-предшественников. Для этого гены *CarRP* *M. circinelloides* и *GGPPs7* *Synechococcus* sp. были слиты через гибкий линкер Gly-Gly-Gly-Ser и интегрированы в геном лучшего штамма GBK19 (рис. 7). Экспрессия слитых генов *fusCarRP-GGPPs7* (где *CarRP* был слит через свой С-концевой участок с *GGPPs7*) увеличила титр астаксантина на 54% с 53,3 мг/л в случае GBK19 до 82,0 мг/л в случае GBK21. Напротив, экспрессия *fusGGPPs7-CarRP* (где *GGPPs7* был слит через свой С-концевой участок с *CarRP*) отрицательно повлияла на продукцию астаксантина (штамм GBK20, рис. 7). Затем в геном штамма GBK21 были введены еще две копии гена фитоендегидрогеназы *M. circinelloides* (*CarB*), что привело к появлению штамма GBK23 (рис. 7). Наконец, в геном GBK23 интегрировали слитые гены *fusCarRP-ERG20<sup>F88C</sup>*. Полученный штамм ВКПМ Y-4871

продуцировал 131,9 мг/л астаксантина в пробирках в богатой среде УР с сахарозой в качестве источника углерода (рис. 7).



Модификации	GBK																	
	4	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>CarRP GGS1 HMG1 ERG12 ERG20</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>CarB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++
<i>HpBKT</i>		+			+	+				++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>BvCrtW</i>			+															
<i>AspCrtW</i>				+														
<i>AaCrtZ</i>					+													
<i>HpCrtZ</i>						+				+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>fus HpBKT-HpCrtZ (E6)</i>							+											
<i>fus HpCrtZ-HpBKT (E6)</i>								+										
<i>fus HpBKT-HpCrtZ (F11)</i>									+									
<i>fus GGPPs7-CarRP</i>														+				
<i>fus CarRP- GGPPs7</i>															+	+	+	+
<i>fus CarRP-ERG20<sup>F88C</sup></i>																		+

**Рис. 7.** Продукция каротиноидов сконструированными штаммами дрожжей *Y. lipolytica*. Клетки культивировали в среде УР с сахарозой в качестве источника углерода в пробирках в течение 5 дней. Столбики ошибок указывают на стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов. Штамм GBK под соответствующим номером из каждого столбца охарактеризован наличием генов из соответствующих строк с помощью обозначения «+» (один «+» подразумевает введение одной копии гена).

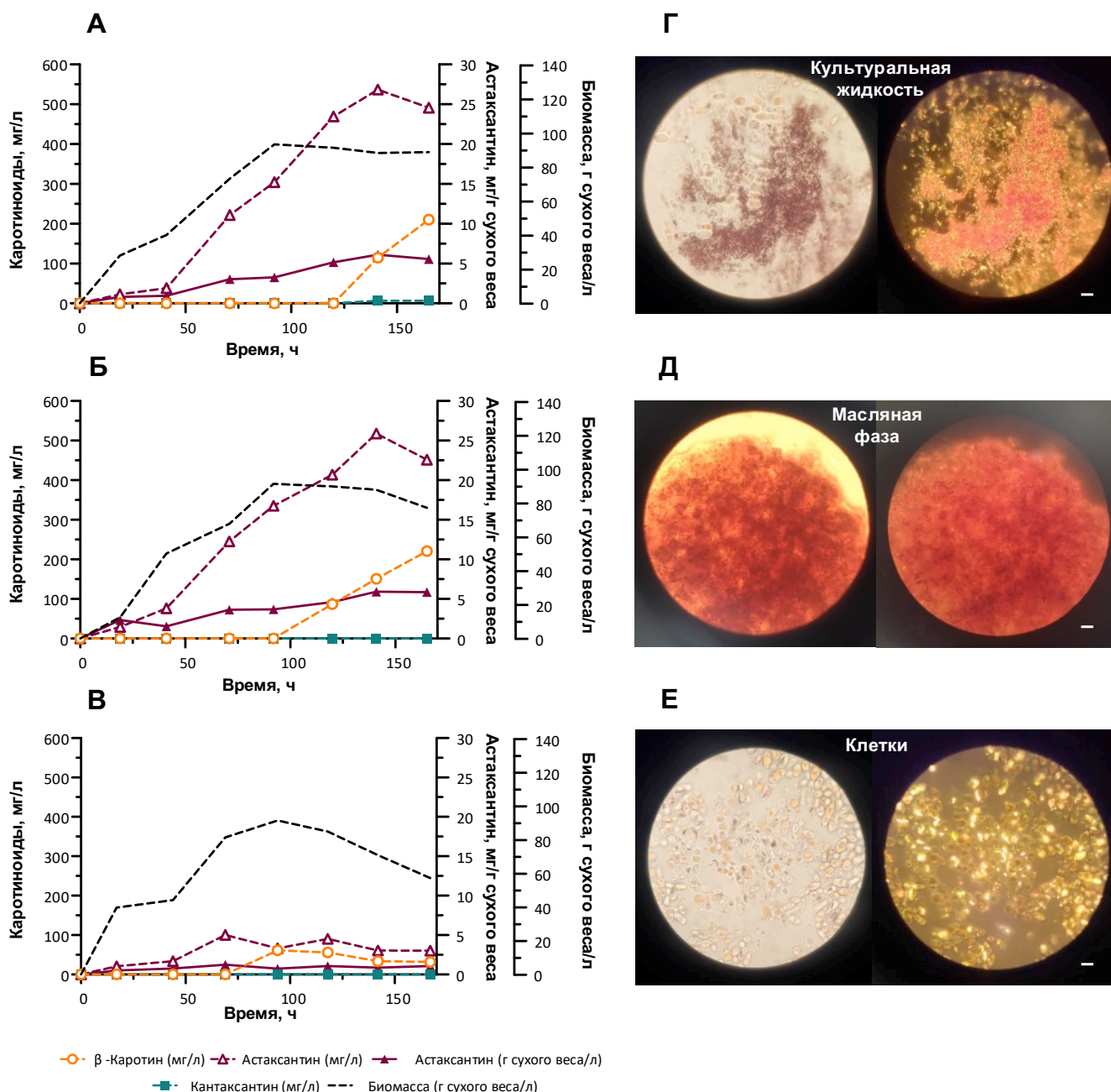


*Оптимизация условий культивирования дрожжей *Y. lipolytica* продуцентов каротиноидов*

На штамме ВКПМ У-4871 было протестировано четыре различных режима культивирования в 3 л биореакторе, отличающиеся скоростью потока питательной среды и исходной концентрацией глюкозы. Наилучший выход на массу глюкозы был достигнут при самой низкой протестированной скорости подпитки 5 г/ч (2,1 мг астаксантина/г глюкозы), при этом максимальный выход на массу глюкозы составил 4,1 на 47 ч культивирования. Титр астаксантина при данном режиме культивирования составил 461 мг/л. Во всех режимах культивирования через 13 ч наблюдалось внутриклеточное образование кристаллов астаксантина, которое продолжалось до конца культивирования (96 ч.).

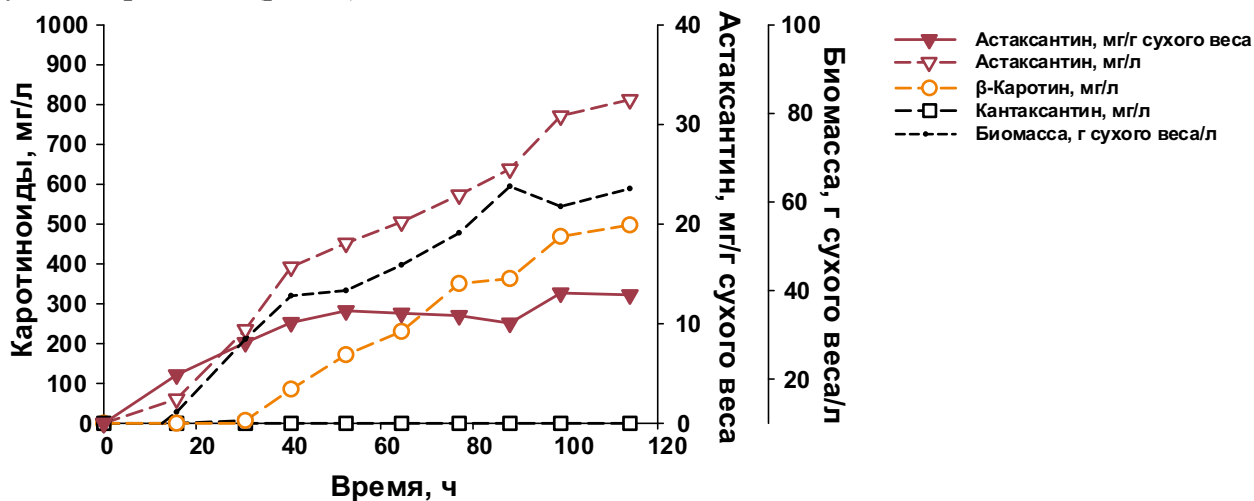
В силу гидрофобности астаксантина возникло предположение о том, что добавление масла в питательную среду может снизить его накопление в клетках благодаря растворению астаксантина в масляной фазе. Это, в свою очередь, могло способствовать синтезу и упростить процесс экстракции продукта по окончании процесса. В связи с чем, используя отобранный режим подпитки глюкозой, были проведены культивирования штамма ВКПМ У-4871 в 3 л биореакторе с тремя режимами добавления оливкового масла (рис. 8). В первых двух случаях использовалось добавление масла до конечной концентрации 5% (об./начальный об.) через 0, 76 и 123 либо через 19, 76 и 123 ч (рис. 8А, Б). Третий режим добавления масла производился до конечных концентраций 15% (об./начальный об.) через 0 ч и 35% (об./начальный об.) через 72 ч (рис. 8В). Суммарный титр астаксантина, полученный из супернатанта, клеток и масляной фазы, при схеме добавления оливкового масла через 0, 76 и 123 ч составил 973,4 мг/л на 168 ч культивирования (рис. 8Г, Д, Е). Такие условия также привели к наиболее эффективному чистому превращению глюкозы в астаксантин с общим расчетным выходом 2,8 мг астаксантина/г глюкозы, что соответствует 357,1 г глюкозы/г астаксантина. Отсрочка первоначального добавления масла на 19 ч после инокуляции привела к значительному снижению количества астаксантина, извлеченного из всего надосадочного раствора, что свидетельствует о том, что секреция астаксантина становится значительной на ранних стадиях культивирования.

Добавление же высоких концентраций масла приводило к значительному снижению внутриклеточной продукции астаксантина до примерно 1 мг/г сухого веса в течение всего культивирования и преобладанию астаксантина, как единственного каротиноида, в масляной фазе. Однако, общий титр был значительно снижен, вероятно, вследствие нарушения метаболических потоков, ведущих к синтезу ацетил-КоА и биопродукции астаксантина.



**Рис. 8.** Культивирование штамма ВКПМ Y-4871 в 3-х литровых биореакторах с добавлением оливкового масла. В качестве источника углерода использовали глюкозу при начальной концентрации 5 г/л, а непрерывную подачу осуществляли при расходе 5 г/ч смесью глюкозы с гидро- и дигидрофосфатами аммония. Динамика показателей при добавлении оливкового масла до конечной концентрации: 5% (об./начальный об.) через 0, 76 и 123 часа (А); 5% (об./начальный об.) через 19, 76 и 123 часа (Б); 15% и 35% (об./начальный об.) через 0 ч и 72 ч соответственно (В). Г, Д, Е - астаксантин, обнаруженный в культуральной жидкости (Г), в верхней маслянистой фазе (Д) и в предварительно промытых клетках (Е) во время периодического культивирования с подпиткой с добавлением оливкового масла в количестве 5% (об./начальный об.) в 0 ч, 76 ч и 123 ч. Изображения оптической световой микроскопии (слева) и микроскопии в поляризованном свете (справа) были получены через 142 часа культивирования. Масштабная линейка представляет 5 мкм.

В совместной работе с компаниями БиоКай и Биомид было проведено культивирование штамма ВКПМ Y-4871 объемом 35 л в 100 литровом биореакторе, используя глицерин в качестве источника углерода. Окончательный общий титр астаксантина 812,3 мг/л (12,9 мг/г сухого веса) был достигнут через 114 часов культивирования (рис. 9).



**Рис. 9.** Культивирование штамма ВКПМ Y-4871 с периодической подпиткой в 100 литровом биореакторе с глицерином в качестве источника углерода. Глицерин подавали в начальной концентрации 31 г/л, а непрерывную подачу смеси глицерина и гидро- и дигидрофосфатов аммония обеспечивали с расходом 8,5 г/ч в течение первых 88 ч, 16,5 г/ч с 88 ч. - по 96 ч, и 12,5 г/ч с 96 ч.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачами настоящей работы было создание *de novo* в клетках *Yarrowia lipolytica* путей биосинтеза нескольких коммерчески ценных терпенов, создание штаммов-продуцентов этих соединений, а также совершенствование и пополнение репертуара инструментов метаболической инженерии и геномного редактирования на основе системы CRISPR-Cas9, необходимых для быстрого и эффективного получения рекомбинантных штаммов. Так, в первой части работы охарактеризованы 17 геномных локусов, предназначенных для интеграции экспрессионных кассет, несущих нативные и гетерологичные гены. Для 13 из них эффективность интеграции составила от 80 до 100%, а для оставшихся четырех – от 17 до 40%.

Характерной чертой генетического аппарата *Y. lipolytica* является высокая частота негомологичной рекомбинации, что затрудняет интеграцию гетерологичной ДНК в целевой локус с помощью системы CRISPR-Cas9. Поэтому в работе было проведено сравнение двух подходов, направленных на увеличение эффективности репарации двунитевого разрыва, внесенного эндонуклеазой Cas9, путем гомологичной рекомбинации. В частности, первый подход подразумевал инактивацию гена *KU70*, контролирующего негомологичное соединение концов молекул ДНК, второй – экспрессию гена *RAD52*, ответственного за протекание

процесса гомологичной рекомбинации в *Saccharomyces cerevisiae*. Из результатов сравнения следовало, что интеграция экзогенной ДНК в локус, в который был внесен разрыв, значительно более эффективна в *ku70*-мутанте, чем в штамме, экспрессирующем *RAD52*.

Направленное внесение делеций в геном с помощью CRISPR-Cas9 требует наличия в клетке конструкции, служащей матрицей для репарации разрыва и содержащей протяженные области гомологии справа и слева от него. Их создание обычно требует одного или нескольких клонирований *in vitro*, в результате чего возрастают время- и трудозатраты на получение рекомбинантных штаммов. В настоящей работе была проанализирована возможность использования в качестве матрицы для репарации линейных фрагментов ДНК длиной всего 120 п.н., полученных в результате отжига двух взаимокomплекментарных олигонуклеотидов. В экспериментах на *ku70*-мутанте доля правильных рекомбинантов составила от 50 до 100%. Этот результат свидетельствует о том, синтетические фрагменты ДНК, несущие короткие области гомологии к последовательности слева и справа от разрыва, могут служить матрицей для репарации и, следовательно, их можно использовать в задачах редактирования генома *Y. lipolytica*.

Инструменты, созданные и усовершенствованные в первой части работы, были успешно использованы в задачах по конструированию штаммов-продуцентов терпенов. В качестве модельных веществ были выбраны линалоол,  $\beta$ -каротин и астаксантин.

В результате оптимизации мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов, введения трех копий гена *AaLIS* *A. arguta*, гена *CrGPPS* *C. roseus*, слитых генов *fusAaLIS-CrGPPS*, а также инактивации нативного гена *DGK1* получен штамм ВКПМ Y-5110. Он был способен накапливать линалоол, содержание которого в культуральной жидкости в 16 раз превышало лучшие значения, ранее описанные в литературе для *Y. lipolytica*. Наибольший эффект на продукцию линалоола оказала экспрессия гена *CrGPPS* самого по себе и в составе конструкции, содержащей слитые гены *fusAaLIS-CrGPPS*. Это говорит о том, что увеличение пула предшественника геранилдифосфата имеет решающее значение для синтеза линалоола.

Продуцент  $\beta$ -каротина конструировали путем оптимизации мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов, экспрессии генов пути биосинтеза  $\beta$ -каротина *CarRP* и *CarB* *M. circinelloides* и слитых генов *fusCarRP-GGPPs7* и *fusCarRP-ERG20<sup>F88C</sup>*. При культивировании полученного штамма ВКПМ Y-4950 в биореакторе было впервые показано внутриклеточное образование кристаллов  $\beta$ -каротина на дрожжах. Затем, на основе штамма-продуцента  $\beta$ -каротина был получен штамм, накапливающий астаксантин. Для этого в геном штамма GBK4 интегрировали гены *HpBKT* и *HpCrtZ* *H. phuvialis*, слитые гены *fusCarRP-GGPPs7* и *fusCarRP-ERG20<sup>F88C</sup>*, в результате чего был получен штамм ВКПМ Y-4871. Несмотря на то, что слияние генов, контролирующих реакции биосинтеза  $\beta$ -каротина было эффективной стратегией для

повышения конечного титра астаксантина и  $\beta$ -каротина, слияние  $\beta$ -каротингидроксилазы и  $\beta$ -каротинкетоллазы не оказало положительного влияния на накопление астаксантина по сравнению с экспрессией каждого фермента по отдельности. Эти результаты не согласуются с литературными данными, в соответствии с которыми экспрессия слитых  $\beta$ -каротингидроксилазы и  $\beta$ -каротинкетоллазы улучшает свойства продуцента астаксантина. Это говорит о том, что влияние эффекта туннелирования субстрата между близко расположенными молекулами ферментов зависит от контекста конкретного штамма. Следовательно, применимость этого подхода при конструировании продуцентов следует оценивать в каждом отдельном случае.

Последняя часть диссертационной работы была посвящена оптимизации условий периодического культивирования с подпиткой штамма ВКПМ Y-4871 – продуцента астаксантина. Было проанализировано влияние начальной концентрации глюкозы в питательной среде и скорости ее внесения в среду. Благодаря этому эксперименту удалось достичь накопления астаксантина на уровне 587,3 мг/л при скорости синтеза 6,3 мг/л/ч и конверсии глюкозы в продукт – 1,9 мг/г глюкозы.

В дальнейшем, в эксперименте в 100-л биореакторе с использованием глицерина в качестве источника углерода общее содержание астаксантина достигло 812,3 мг/л через 114 часов культивирования. В этой работе были использованы лишь простые питательные среды, а подпитка представляла собой раствор глюкозы или глицерина в качестве источника углерода и минеральных солей, поэтому технология производства астаксантина с применением описанных штаммов и методов культивирования может быть легко масштабирована для промышленного производства. Дополнительно, была проанализирована возможность улучшения показателей процесса с помощью внесения в питательную среду оливкового масла. Из результатов этого эксперимента следовало, что такой подход позволяет добиться снижения накопления астаксантина в клетках и получения более чистого продукта с меньшим содержанием примеси  $\beta$ -каротина. Кроме того, культивирование продуцента в питательной среде с маслом может в значительной степени упростить последующие стадии экстракции каротиноидов.

Таким образом, настоящая работа дополняет репертуар инструментов метаболической инженерии и геномного редактирования *Y. lipolytica*, их использование для конструирования штаммов-продуцентов терпенов и разработку технологии биосинтеза этих соединений. Мы надеемся, что представленные результаты позволят усовершенствовать и снизить стоимость промышленных процессов производства природных терпенов биотехнологическим способом, а также окажутся полезными для исследователей, ведущих свои научные изыскания в этой области.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод инактивации генов *Y. lipolytica* с использованием системы редактирования генома CRISPR-Cas9 и коротких линейных фрагментов ДНК в качестве матрицы для репарации, полученных в результате отжига двух синтетических взаимокomплекментарных олигонуклеотидов. Эффективность инактивации генов в штамме со сниженной частотой негомологичной рекомбинации (с нокаутом гена *KU70*) составляла от 50 до 100%.
2. Выявлены 13 новых хромосомных локусов, эффективность CRISPR-Cas9-зависимой интеграции экспрессионных кассет в которые составила от 80 до 100 %.
3. Описан новый промотор pAraDH2 *Y. lipolytica*, эффективный для экспрессии гетерологичных генов при конструировании продуцента  $\beta$ -каротина.
4. Выявлена важная роль экспрессии гена *CrGPPS C. roseus*, кодирующего геранилдифосфатсинтазу, и слитых генов *CrGPPS* и *AaLIS A. argute*, кодирующего линалоолсинтазу (*fusCrGPPS-AaLIS* и *fusAaLIS-CrGPPS*) для повышения уровня накопления линалоола рекомбинантными штаммами дрожжей *Y. lipolytica*.
5. Продемонстрирована эффективность слияния генов *fusCarRP-GGPPs7* и *fusCarRP-ERG20<sup>F88C</sup>*, (где *CarRP M. circinelloides*, кодирует бифункциональный фермент фитоенсинтазу/ликопин- $\beta$ -циклазу, *GGPPs7 Synechococcus* sp. кодирует геранилгеранилдифосфатсинтазу, мутантный аллель *Y. lipolytica ERG20<sup>F88C</sup>* кодирует фарнезилдифосфатсинтазу), контролирующих сопряженные этапы метаболизма каротиноидов при генетическом конструировании продуцентов астаксантина и  $\beta$ -каротина.
6. Получены рекомбинантные штаммы *Y. lipolytica* продуценты астаксантина и  $\beta$ -каротина по уровню продуктивности сопоставимые с лучшим мировым аналогом и перспективные для использования при разработке промышленных биотехнологий производства этих каротиноидов.

## ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в журналах, соответствующих Перечню ВАК

1. Юзбашева Е. Ю., Юзбашев Т. В., Виноградова Е. Б., Косихина Ю. М., **Таратынова М. О.**, Дементьев Д. А., Соловьев А. И., Егорова Д. А., Синеокий С. П. Применение CRISPR/Cas9 - системы редактирования генома в дрожжах *Yarrowia lipolytica* для инактивации гена *YIACL2*, кодирующего АТФ-зависимую цитратлиазу // Биотехнология. – 2020. – Т. 36. – № 1. – С. 16–24. doi:10.21519/0234275820203611624.
2. **Таратынова М. О.**, Косихина Ю. М., Виноградова Е. Б., Дементьев Д. А., Коробов В. С., Золотцев В. А., Юзбашев Т. В., Юзбашева Е. Ю., Синеокий С. П. Накопление нейтральных липидов и  $\beta$ -каротина дрожжами *Yarrowia lipolytica* на среде с сахарозой в качестве источника углерода // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. – № 3. – С. 29–41. doi:10.21519/0234-2758-2021-37-3-29-41.
3. Yuzbasheva E. Y., **Taratynova M. O.**, Fedyaeva I. M., Dementev D. A., Korobov V. S., Fedorov A. S., Vidal L. S., Yuzbashev T. V., Sineoky S. P., Mikheev M. Large-scale bioproduction of natural astaxanthin in *Yarrowia lipolytica* // Bioresource Technology Reports. – 2023. – V. 21. – P. 101289. doi:10.1016/j.biteb.2022.101289.
4. **Таратынова М. О.**, Федяева Ю. М., Дементьев Д. А., Мелькина О. Е., Юзбашев Т. В., Синеокий С. П., Юзбашева Е. Ю. Новый промотор pAraDH2 дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Биотехнология. – 2023. – Т. 39. – № 1. – С. 27–38. doi:10.56304/S0234275823010106.
5. **Taratynova M. O.**, Tikhonova E. E., Fedyaeva I. M., Dementev D. A., Yuzbashev T. V., Solovyev A. I., Sineoky S. P., Yuzbasheva E. Y. Boosting geranyl diphosphate synthesis for linalool production in engineered *Yarrowia lipolytica* // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2024. – V. 196(3). – P. 1304–1315. doi:10.1007/s12010-023-04581-z

### Результаты интеллектуальной деятельности

1. Юзбашева Е. Ю., **Таратынова М. О.**, Косихина Ю. М., Юзбашев Т. В., Дементьев Д. А., Андреева Н. И., Федоров А. С., Синеокий С. П. Модифицированная нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий активностью фитоен синтазы и геранилгеранилпирофосфат синтазы (варианты), ее использование при конструировании трансформантов дрожжей *Yarrowia lipolytica*, продуцирующих каротиноиды. Патент РФ №2794980 рег. 26.04.2023.
2. **Таратынова М. О.**, Юзбашева Е. Ю., Федяева Ю. М., Дементьев Д. А., Синеокий С. П. Трансформант дрожжей *Yarrowia lipolytica*, продуцирующий линалоол. Патент РФ №2809554 рег. 12.12.2023.

### Материалы конференций

1. **Таратынова М. О.**, Юзбашева Е. Ю., Косихина Ю. М., Синеокий С. П. Разработка CRISPR-Cas9 системы редактирования генома дрожжей *Yarrowia lipolytica* на примере синтеза  $\beta$ -каротина // тезисы VII международной научно-практической

конференции «Биотехнология: наука и практика», 16-20 сентября 2019, г. Севастополь, С. 602.

2. **Таратынова М. О.**, Косихина Ю. М., Юзбашева Е. Ю. Создание штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica* продуцента  $\beta$ -каротина // Материалы «3-го Российского микробиологического конгресса», 26 сентября – 1 октября 2021, г. Псков, С. 270.