

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи



ТАРАТЫНОВА Мария Олеговна

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

1.5.7. «Генетика»

диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель

д-р биол. наук, проф.

Синеокий Сергей Павлович

Москва, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. ВВЕДЕНИЕ	4
II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	10
1. Обзор литературы	10
1.1. Дрожжи <i>Yarrowia lipolytica</i>	10
1.1.1. Характеристика дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i>	10
1.1.2. Источники углерода, утилизируемые <i>Yarrowia lipolytica</i>	11
1.1.3. Применение дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> в биотехнологической промышленности	11
1.2. Генетический инструментарий для работы с <i>Yarrowia lipolytica</i>	12
1.3. Производные терпенов и терпеноидов, получаемые биотехнологическим путем на дрожжах <i>Yarrowia lipolytica</i>	14
1.3.1. Способы биотехнологического производства веществ класса монотерпенов	28
1.3.2. Способы биотехнологического производства веществ класса тетратерпенов	31
2. Материалы и методы	39
2.1. Штаммы и среды	39
2.2. Конструирование штаммов	40
2.3. Культивирование в биореакторе	60
2.4. Методы анализа	61
3. Результаты и обсуждение	65
3.1. Совершенствование системы редактирования генома дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i>	65
3.1.1. Внесение делеций с помощью CRISPR-Cas9 системы редактирования генома дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i>	65
3.1.2. Интеграция генов с помощью системы редактирования генома <i>Y. lipolytica</i> на основе CRISPR-Cas9	71
3.2. Создание штамма <i>Y. lipolytica</i> - платформы для конструирования продуцентов терпенов и терпеноидов	73
3.3. Создание штамма <i>Y. lipolytica</i> , синтезирующего монотерпен линалоол	76
3.4. Создание штамма дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> , синтезирующего β -каротин	82
3.4.1. Конструирование штамма дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> - продуцента β -каротина	82
3.4.2. Новый промотор дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> и его применение при конструировании штамма продуцента β -каротина	87
3.5. Создание штамма <i>Yarrowia lipolytica</i> – продуцента астаксантина	91
3.6. Оптимизация условий культивирования штаммов <i>Yarrowia lipolytica</i> - продуцентов каротиноидов	94
III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
IV. ВЫВОДЫ	108
V. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	109
VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118

VII. СПИСОК ІЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРІАЛУ	138
VIII. ПРИЛОЖЕННЯ	143
БЛАГОДАРНОСТІ	149

I. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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, β -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, β -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 β -каротина и астаксантина в дрожжах *Y. lipolytica*.
4. Конструирование штаммов-продуцентов соединений терпенового ряда: β -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, β -каротина и астаксантина на платформе *Y. lipolytica*.

Впервые показана эффективность экспрессии гетерологичного гена *CrGPPS Catharanthus roseus*, кодирующего геранилдифосфат синтазу, 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 β -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).

β -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, β -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 β -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 β -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 кассет 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 данной работе применялась разработанный нашей

исследовательской группой упрощенный и ускоренный способ изменения последовательности gRNA на Cas9-вспомогательных плазидах, позволяющая полностью обойти сложные этапы клонирования *in vitro*, применяемые в других методиках, описанных в литературе. В данной работе приведена методика CRISPR-Cas9-опосредованной инактивации ряда генов *Y. lipolytica* с помощью коротких двунитевых фрагментов ДНК, что позволяет в качестве субстрата для репарации использовать синтетические олигонуклеотиды длиной 120 нуклеотидов вместо протяженного фрагмента ДНК, находящегося в составе плазмидного вектора.

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) β -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).

Методология и методы исследования

В ходе выполнения работы были использованы стандартные генетические и молекулярно-биологические методы исследований. Был использован широкий ряд молекулярно-генетических методов (генно-инженерные методы клонирования генов и конструирования плазмид, полимеразная цепная реакция, трансформация дрожжевых и бактериальных клеток), методы микроскопии, электрофореза ДНК в агарозном геле. Результаты культивирования

анализировались с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией. Для измерения промоторной активности был использован флуоресцентный анализ. Для анализа кинетики роста клеток проводили культивирование в качалочном инкубаторе-спектрофотометре.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование промотора pAraDH2 дрожжей *Y. lipolytica* для экспрессии гетерологичных генов эффективно при конструировании штамма, продуцирующего β -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^{F88C}* при конструировании рекомбинантных продуцентов β -каротина или астаксантина на дрожжах *Y. lipolytica* значительно повышает продукцию β -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 β -каротина.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты исследования изложены убедительно и последовательно, подтверждены статистическим анализом и отражают основное содержание диссертационной работы. Их анализ позволил сформулировать аргументированные выводы и практические предложения, которые согласуются с поставленной целью и задачами работы. Диссертация апробирована и рекомендована к защите на заседании Научно-технического совета КК НБИКС-ПТ НИЦ «Курчатовский институт» (Протокол № 109-3прНТС от «08» июня 2023 года заседания № 3).

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.

II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Обзор литературы

1.1. Дрожжи *Yarrowia lipolytica*

1.1.1. Характеристика дрожжей *Yarrowia lipolytica*

Облигатно аэробные маслянистые аскомицетные гетероталлические диморфные дрожжи *Yarrowia lipolytica* в зависимости от условий роста могут переходить из дрожжевой формы в псевдомицелий или мицелий. Управлением в сфере пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) дрожжи *Y. lipolytica* рассматриваются как непатогенные и в целом безопасные (GRAS) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2018). Ранее дрожжи *Y. lipolytica* назывались *Cuida lipolytica* и включались в группу дейтеромицетов до описания у них полового процесса. После открытия у этих дрожжей аскоспор их переклассифицировали и переименовали в *Endomycopsis lipolytica*, далее *Saccharomycopsis lipolytica*, и, наконец, с 1980 года – *Yarrowia lipolytica*. Название «*lipolytica*» отражает способность этих дрожжей утилизировать субстраты, которые содержат н-парафины и масла. *Y. lipolytica* – небродящие дрожжи, относящиеся к порядку *Saccharomycetales* (Wolf, 1996). Дрожжи *Y. lipolytica* часто выделяют из липидсодержащих сред обитания, таких как молочные продукты, загрязненные среды и сырое мясо птицы. Они особенно приспособлены к гидрофобным субстратам, таким как н-алканы, жирные кислоты, жиры и масла (Fickers *et al.*, 2005). Генетический материал дрожжей *Y. lipolytica* представлен 6 хромосомами, содержащимися в ядре клеток (от А до F) и геномом митохондрии (Dujon *et al.*, 2004; Pomraning *et al.*, 2015). Геномная последовательность *Y. lipolytica* говорит о их родстве с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, однако последовательность имеет более низкую плотность генов — значение, которое составляет 46,3% у *Y. lipolytica* по сравнению с 70,3% у *S. cerevisiae* (Dujon *et al.*, 2004). Благодаря этому, существует большое число областей, не содержащих рамок считывания, что может быть использовано для интеграции в заданные локусы хромосом. Эти дрожжи обладают двумя типами спаривания MatA и MatB, а природные изоляты в большинстве случаев гаплоидны (Barth *et al.*, 1997). В лабораторных условиях чаще работают с гаплоидными штаммами, однако существуют стратегии модификации генома, повышающие плоидность, что может улучшить полезные для промышленного применения свойства, включая генетическую стабильность, стрессоустойчивость и продуктивность (Han *et al.*, 2020).

1.1.2. Источники углерода, утилизируемые *Yarrowia lipolytica*

Одной из значимых сторон использования *Y. lipolytica* в производственных целях является их способность расти на широком спектре источников углерода, включая отходы производства. Авторами Rodrigues и Pais было показано, что *Y. lipolytica* может использовать уксусную, молочную, пропионовую, яблочную, янтарную, лимонную и олеиновую кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии (Rodrigues *et al.*, 2000). Рост также наблюдается при использовании спиртов (этанол, глицерин) в качестве источника углерода (Barth *et al.*, 1997; Spagnuolo *et al.*, 2018). Среди гидрофильных субстратов *Y. lipolytica* способна утилизировать глюкозу, фруктозу и маннозу (Soong *et al.*, 2019). Однако, природные изоляты не способны утилизировать сахарозу, так как не экспрессируют расщепляющий сахарозу фермент — инвертазу (Coelho *et al.*, 2010). Транспорт сахаров через мембрану осуществляется специфическими транспортерами, которых у дрожжей *Y. lipolytica* насчитывают по крайней мере 24, причем 6 из них идентифицированы строго как транспортеры гексоз (Lazar *et al.*, 2017).

Одним из способов удешевления сред культивирования является использование более дешевых источников углерода. Так, вместо глюкозы может применяться меласса, побочный продукт производства, содержащий около 50% сахарозы. Показано, что гетерологичная экспрессия в *Y. lipolytica* гена *ScSUC2 S. cerevisiae*, кодирующего инвертазу совместно с экспрессией нативного гена *HXK1 Y. lipolytica*, кодирующего гексокиназу приводит к эффективному росту дрожжей на сахарозе, как единственном источнике углерода (Lazar *et al.*, 2014; Moeller *et al.*, 2012). Также разработаны подходы, адаптирующие *Y. lipolytica* к потреблению целлобиозы, ксилозы и других источников углерода (Ledesma-Amaro *et al.*, 2016).

1.1.3. Применение дрожжей *Yarrowia lipolytica* в биотехнологической промышленности

В настоящее время *Y. lipolytica* используются для промышленного производства двух видов пищевых и кормовых добавок: каротиноидов и масел, богатых полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) (Madzak, 2021). Технология производства каротиноидов *Y. lipolytica* была разработана компанией Microbia (США), а затем приобретена компанией DSM (Heerlen, Нидерланды) (Sibirny *et al.*, 2015). Компания DuPont (США) разработала технологию производства ПНЖК на базе штамма *Y. lipolytica*, благодаря которой был начат промышленный выпуск продуктов, богатых ω -3-эйкозапентаеновой кислотой (Xue *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2015).

Y. lipolytica может быть перспективным организмом-хозяином для промышленного производства других химических веществ, в том числе терпеноидов, биотехнологическим путем.

1.2. Генетический инструментарий для работы с *Yarrowia lipolytica*

Важным преимуществом *Y. lipolytica* является широкий спектр генетических инструментов, разработанных для манипуляций геномом. Появление новых систем редактирования дрожжей *Y. lipolytica* привело к значительному удешевлению и упрощению генетического конструирования. Одной из таких систем редактирования является технология Cre-lox. Поскольку количество селективных маркеров у *Y. lipolytica* ограничено, необходимы эффективные процедуры, обеспечивающие их повторное использование. В работах Р. Fickers и соавторов, выполненных под руководством J.M. Nicaud, описаны конструкции, в которых селективный маркер фланкирован сайтами loxP, что обеспечивало его быстрое удаление посредством рекомбиназы Cre, которая индуцировала рекомбинацию между сайтами lox (Fickers *et al.*, 2003). В качестве маркеров использовали гены оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазы *URA3*, 3-изопропилмалатдегидрогеназы *LEU2* и фосфотрансферазы гигромицина В *hph*. Для вырезания маркеров по lox-сайтам использовали автономную плазмиду, несущую ген Cre-рекомбиназы под контролем гибридного промотора hr4d. Описанная авторами стратегия может быть использована для последовательного удаления нескольких генов, используя кассеты с разными маркерами (*URA3*, *LEU2*, *hph*), с последующим однократным вырезанием маркеров по lox-сайтам.

Для направленного введения генетических модификаций были разработаны инженерные нуклеазы, которые способны распознавать специфические последовательности ДНК *in vivo* и индуцировать двухцепочечный разрыв ДНК. Разрыв ДНК запускает механизмы репарации, что в конечном итоге приводит к редактированию генов. Наиболее широко используемыми ферментами у дрожжей *Y. lipolytica* являются нуклеазы с транскрипционным активатором (TALEN) и CRISPR-Cas9 (Wheeldon *et al.*, 2021; Larroude *et al.*, 2018). В результате активности систем CRISPR-Cas9 или TALENs в ДНК вносится двухцепочечный разрыв в области протоспейсера CRISPR-Cas9 или спейсерной последовательности, разделяющей сайты узнавания TALEN. В отсутствие гомологичной донорной ДНК двухцепочечный разрыв репарируется путем негомологичного соединения концов (NHEJ). Важно отметить, что известной особенностью *Y. lipolytica* является преимущественное использование репарации при помощи негомологичного соединения концов. В связи с этим даже использование длинных фланкирующих последовательностей (до 1000 п.н.), гомологичных участкам хромосом рядом с разрывом, не

приводит к достаточной частоте интеграции. Для повышения частоты интеграции используют инактивацию гена *KU70*, контролирующего негомологичную рекомбинацию (Verbeke *et al.*, 2013). Так, благодаря мутации $\Delta ku70$ частота интеграции с фланкирующими фрагментами в 50 п.н. для делеции гена *ADE2*, кодирующего аденилосукцинатсинтетазу, составила 43%. Еще одним способом, повышающим частоту интеграции, является внесение в геном *Y. lipolytica* гена *RAD52 S. cerevisiae* (частота использования кодонов в последовательности которого была адаптирована для *Y. lipolytica*), ответственного за репарацию путем гомологичной рекомбинации (Ji *et al.*, 2020).

Часто используемым методом сборки ДНК, применяемым для конструирования интеграционных кассет для *Y. lipolytica*, является метод сборки Гибсона (Gibson, 2011). Данный метод позволяет собирать несколько фрагментов ДНК независимо от их длины. Перекрывающиеся молекулы ДНК могут соединяться под действием трех ферментов: экзонуклеазы, которая генерирует выступающие концы ДНК, позволяя им специфически отжигаться друг на друге; полимеразы, заполняющей пробелы в отоженных продуктах; и лигазы, которая объединяет цепи ДНК в области однонитевого разрыва (Larroude *et al.*, 2018). Еще одной технологией сборки ДНК, которая быстро заслужила популярность, является метод сборки Golden Gate. Метод сборки Golden Gate был адаптирован для *Y. lipolytica* (Celinska *et al.*, 2017). Он представляет собой модульную систему клонирования с использованием ферментов рестрикции II типа. Принцип работы метода основан на использовании библиотеки стандартизированных и взаимозаменяемых частей ДНК, которые впоследствии могут быть собраны в ходе одностадийной реакции в одной пробирке путем соединения в целевую плазмиду по заранее спроектированным с помощью сайтов рестрикции липким концам длиной 4 нуклеотида.

Технологии CRISPR-Cas9, Cre-lox и Golden Gate были объединены в инструментарии нового поколения для эффективной метаболической инженерии *Y. lipolytica* (Yuzbashev *et al.*, 2022). Инструментарий подразумевает быстрое переключение между безмаркерными и содержащими маркер интегративными конструкциями с помощью штамма *E. coli*, экспрессирующего Cre; метод перенаправления интегративных кассет в альтернативные геномные локусы через замену фланкирующих областей гомологии с помощью Golden Gate; метод замены последовательностей gRNA путем *in vivo* рекомбинации Cas9-вспомогательных плазмид и однонитевых олигонуклеотидов.

Таким образом, благодаря разработанному генетическому инструментарию, *Y. lipolytica* удобно использовать в качестве модельного объекта для конструирования штамма-продуцента.

1.3. Производные терпенов и терпеноидов, получаемые биотехнологическим путем на дрожжах *Yarrowia lipolytica*

Терпены и кислородзамещенные производные терпенов, терпеноиды, – полимеры с низкой степенью полимеризации мономера изопрена (непредельного углеводорода с общей формулой C_5H_8). Производные терпенов и терпеноидов широко распространены в природе и являются важными составляющими всех живых организмов, включая бактерий, архей, протистов и эукариот. В первичном метаболизме терпены и их производные участвуют как компоненты, необходимые для основных клеточных функций. Например, они входят в состав пренильных цепей хинонов (убихинона и пластохинона), фотосинтетических пигментов (фитола в хлорофилле и каротиноидных пигментов), стеринов (большинство из которых отвечает за стабильность мембран), гормонов роста (гиббереллинов), а также участвуют в пренилировании белков (посттрансляционную модификацию, облегчающую ассоциацию белков с клеточными мембранами) (Tetali, 2019). В качестве продуктов вторичного метаболизма они выполняют функции аттрактантов опыления, средств отпугивания травоядных, репеллентов, антибактериальных соединений, аллелопатических и токсичных молекул, антиоксидантов, молекул термотолерантности и фотозащиты (Tetali, 2019).

Терпены представляют собой один из самых крупных и разнообразных классов, в котором выделено более 55 000 членов (Maimone *et al.*, 2007). Хотя терпены формально состоят только из одной биосинтетической единицы, они могут быть перегруппированы и сильно окислены. Поэтому задача создания их синтетическим путем сравнима по сложности с проблемой синтеза многих других вторичных метаболитов (Maimone *et al.*, 2007). Биосинтез терпенов и терпеноидов проходит через активированные изопреновые производные - изопентенилдифосфат (IPP) и его аллильный изомер – диметилаллилдифосфат (DMAPP). В свою очередь, молекулы IPP и DMAPP могут быть синтезированы через мевалонатный путь (MVA) или метилэритритолфосфатный путь (MEP). У эукариот и архей чаще встречается путь MVA, тогда как у большинства бактерий и в пластидах растений обычно используется MEP путь (Boronat *et al.*, 2015). Однако, на дрожжах *Y. lipolytica* были получены данные показывающие, что помимо классического пути синтеза изопреноидов MVA, возможно использование нативного пути MEP, который способен активироваться в условиях голодания по азоту (Dissook *et al.*, 2021). Далее активированные изопреновые звенья чаще всего соединяются друг с другом по принципу «голова к хвосту», где в одном изопреновом звене метильную группу с группой с двойной связью именуют «головой», а другую сторону – «хвостом» (рисунок 1; Грандберг, 2001). Таким способом происходит синтез регулярных линейных терпенов. В случае синтеза нерегулярных терпенов связь между звеньями может образовываться по принципу «хвост к хвосту» (например, в случае сквалена, β -каротина

и ликопина в результате конденсации хвостов двух пирофосфатных соединений), или «голова к голове» (у некоторых терпенов в нефти) (Zografos, 2016; Moldowan *et al.*, 1979).

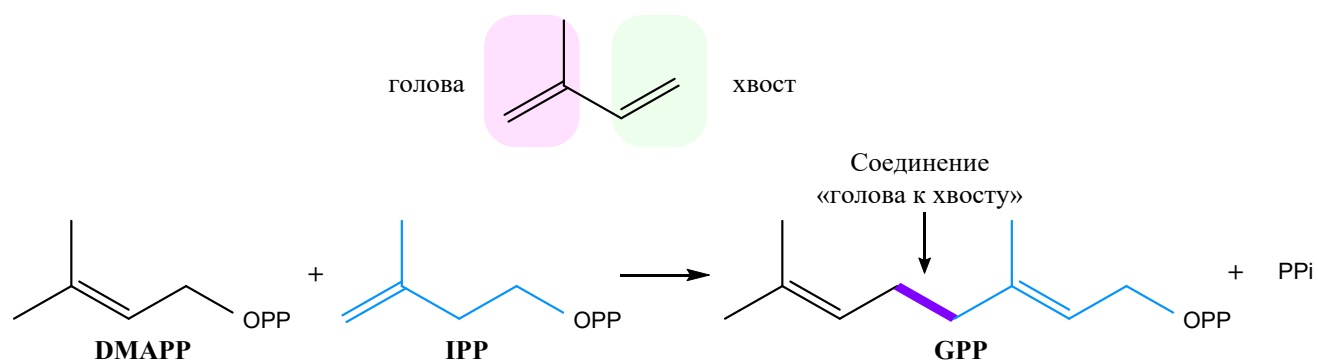


Рисунок 1. Схематичное изображение соединения активированных изопреновых молекул IPP и DMAPP по принципу «голова к хвосту» (линия связи выделена фиолетовым). Сверху в молекуле изопрена розовым цветом выделено расположение «головы» и зеленым – «хвоста».

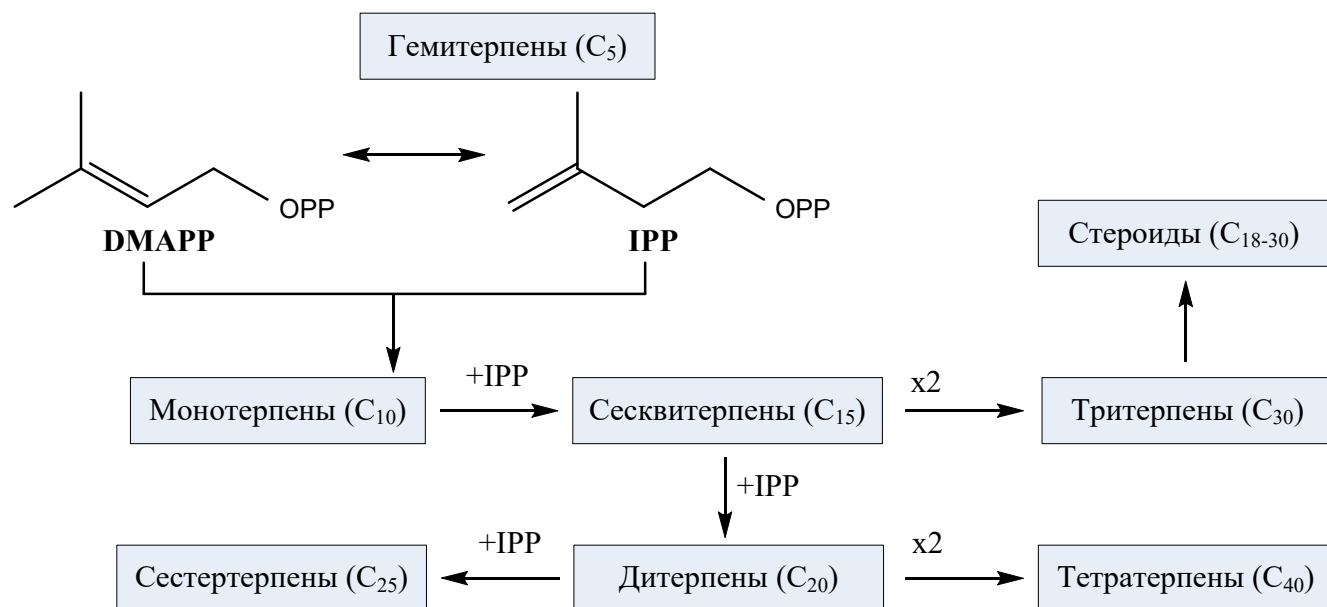


Рисунок 2. Классификация терпенов по числу звеньев мономера из пяти атомов углерода. Конденсация двух одинаковых молекул изображена как x2; реакция с участием присоединения изопентилдифосфата схематично показана как +IPP.

Классифицировать терпены принято по числу звеньев из пяти атомов углерода, независимо от их разнообразных связей. Таким образом, таксономически терпены подразделяются на гемитерпены (C₅), монотерпены (C₁₀), сесквитерпены (C₁₅), дитерпены (C₂₀), сестертерпены (C₂₅), тритерпены (C₃₀) и тетратерпены (C₄₀), а также политерпены, когда число углеродных атомов превышает 40, как в случае натурального каучука (рисунок 2) (Zografos, 2016). Однако, при биосинтезе терпенов углеродные скелеты могут перестраиваться, например,

путем циклизации или модификации, что приводит к потере или добавлению атомов углерода, в следствии чего конечное число атомов углерода может не быть кратным 5.

Под действием *цис*-, или *транс*-типов пренилтрансфераз может происходить конденсация терпенов с *цис*- (или *Z*), или *транс*- (или *E*) удлинением пренильной цепи. Реакции с образованием геранилдифосфата (GPP) (с числом углеродных звеньев C10), фарнезилдифосфата (FPP) (C15) и геранилгеранилдифосфата (GGPP) (C20), предшественников различных классов терпенов, катализируются *транс*-пренилтрансферазами, в то время как реакции биосинтеза нерилдифосфата, натуральных каучуков, пептидогликана в прокариотах и гликопротеина у эукариот катализируются *цис*-пренилтрансферазами (Fujihashi *et al.*, 2001; Schilmiller *et al.*, 2009).

Общая схема биосинтеза каротиноидов (тетратерпенов с числом углеродных звеньев C40) основана на конденсации двух молекул геранилгеранил-дифосфата (GGPP) под действием фарнезилдифосфатсинтазы и геранилгеранилдифосфатсинтазы. Из двух молекул GGPP под действием фитоенсинтазы образуется фитоен. Далее происходит превращение фитоена в ликопин с помощью дегидрогеназной реакции, осуществляемой фитоендегидрогеназой. После чего, из ликопина синтезируется β -каротин с помощью ликопин- β -циклазы (Zhang *et al.*, 2020c). Известно, что обе реакции синтеза фитоена и β -каротина может катализировать один бифункциональный фермент фитоенсинтаза/ликопин- β -циклаза (Velayos *et al.*, 2000). Синтез кантаксантина осуществляется из β -каротина путем введения кето-групп с помощью β -каротинкетотазы (Chen *et al.*, 2022a). Синтез астаксантина осуществляется из кантаксантина путем введения гидроксигрупп с помощью β -каротин-3-гидроксилазы (Tramontin *et al.*, 2019), либо из β -каротина посредством окисления β -каротина астаксантинсинтазой, работающим в сопряженной реакции с цитохром P450 редуктазой (Kildegaard *et al.*, 2017).

На данный момент, благодаря успехам метаболической инженерии на микроорганизмах, таких как дрожжи *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* и бактерии *E. coli*, были получены представители из каждого класса терпенов. Для удобства литературные данные, описывающие пути получения веществ терпенового ряда, приведены в таблице 1.

E. coli широко используются для гетерологичного синтеза терпенов. Однако, присущим свойством *E. coli* является синтез эндотоксина, что делает этот объект непригодным для производства веществ терпенового ряда в целях потребления человеком (Zhou *et al.*, 2015).

Считается, что путь MVA, встречающийся у дрожжей, более эффективен для синтеза предшественников IPP и DMAPP, чем путь MEP, присущий *E. coli* (Mai *et al.*, 2021). В этой связи *S. cerevisiae* рассматривается как перспективный организм для синтеза терпенов (Mai *et al.*, 2021). Характерными чертами метаболизма *Y. lipolytica* является накопление липидов, а также высокий

поток углерода через предшественников ацил-КоА и цикл трикарбоновых кислот (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2018). Более высокое содержание липидов в *Y. lipolytica*, по сравнению с *S. cerevisiae*, способствует накоплению гидрофобных продуктов и может уменьшить негативный эффект от внутриклеточного накопления токсичных терпенов (Mai *et al.*, 2021). Мевалонатный путь синтеза терпенов начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА. Высокое внутриклеточное содержание ацетил-КоА обеспечивает благоприятную метаболическую среду для экспрессии соответствующих гетерологичных путей и может позволить *Y. lipolytica* эффективно синтезировать соединения класса терпенов (Miller *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017a).

Таблица 1. Метаболическая инженерия *Yarrowia lipolytica* и других микроорганизмов для биосинтеза терпеноидов.

Класс	Соединение	Среда культивирования и источник углерода	Родительский штамм и организм	Соответствующие модификации, связанные с биосинтезом терпенов*	Титр	Ссылки
Моно-терпены (C10)	Лимонен	YP, глюкоза, додекан	<i>Y. lipolytica</i> Po1g	<i>HMG1 CILS</i> (d-лимоненсинтаза) или <i>MsLS</i> (l-лимоненсинтаза)	D-Лимонен: 11,7 мг/л L-Лимонен: 11,1 мг/л (5 л биореактор)	(Pang <i>et al.</i> , 2019)
		YP, глюкоза, пировиноградная кислота	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>ArtLS SltNDPS1 HMG1 ERG12</i>	23,6 мг/л, 1,36 мг/г сухого веса (колбы)	(Cao <i>et al.</i> , 2016)
		2×YP, глицерин, цитрат	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>ArtLS SltNDPS1 HMG1 ERG12</i>	165,3 мг/л (1,5 л биореактор)	(Cheng <i>et al.</i> , 2019a)
		YP, глюкоза, додекан	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 20460	<i>HMG1 ERG12 ACL1 Seacs IDI ERG20^{F88W-N119W} ↓SQS PfLS</i>	35,9 мг/л (пробирки)	(Arnesen <i>et al.</i> , 2020)
		SC, глюкоза, IPM, на 20 час добавлен этанол	<i>S. cerevisiae</i> yJGZ1	<i>ID11 tHMG1 SINDPS1 CtlLS2</i>	917,7 мг/л (биореактор)	(Cheng <i>et al.</i> , 2019b)
		SD, галактоза, рафиноза	<i>S. cerevisiae</i> EGY48	<i>EfmvaS EfmvaE ERG12 ERG8 ERG19 IDI ScERG20^{N127W} CILS</i> (Компартментализация)	2,6 г/л (колбы)	(Dusseaux <i>et al.</i> , 2020)

		М9, глицерин	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>atoB ScERG13 tScHMG1 ScERG12 ScERG8 ScERG19 IDI tAgGPPS2 tMsLS</i>	3,6 г/л (3,1 л биореактор)	(Rolf <i>et al.</i> , 2020)
α-Пинен		УР, глюкоза, в последствии замененная на гидролизат лигноцеллюлозы	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>AMPD HMG1 ERG12 ERG8 tSINDPS1 PtPS tPtPS</i>	36,1 мг/л (колбы)	(Wei <i>et al.</i> , 2021)
		SC-Leu-Trp, глюкоза	<i>S. cerevisiae</i> yJGZ1	<i>ScERG20^{F96W-N127W} PtPS tPtPS</i> слитые гены <i>ScERG20^{F96W-N127W}-tPtPS IDI MAF1</i> замена промотора на слабый pHXT1 перед геном <i>ScERG20</i>	11,7 мг/л (колбы)	(Chen <i>et al.</i> , 2019b)
		SBMSN среда, сахара (совместное культивирование 2-х штаммов)	<i>E. coli</i> BW25113	<i>PpttgB AgGPPS^{D90G-L175P}-PtPS^{Q457L}</i> интеграция мевалонатного пути, толерантность к пинену, устойчивость к фосмидомицину	166,5 мг/л (колбы)	(Niu <i>et al.</i> , 2018)
Линалоол		УР, цитрат, пируват, додекан	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>AaLIS ERG20^{F88W-N119W} HMG1 IDI</i>	S-Линалоол: 7,0 мг/л (колбы)	(Cao <i>et al.</i> , 2017)
		Колбы: ТВ, глицерин, ИРМ. Биореактор:	<i>E. coli</i> BL21	<i>mk bLIS CmR29*bLIS AgGPPS2</i>	R-Линалоол: 100,1 мг/л (колбы) 1,03 г/л (1,3 л биореактор)	(Wang <i>et al.</i> , 2020b)

		минеральная среда АМ, глицерин, лимонная кислота, IPM				
		YP, глюкоза, IPM	<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>ERG10 HMG1 2xtHMG1 ERG12</i> <i>ScERG8 MVD IDI t67OMcLIS^{E343D-}</i> <i>E352H ScERG20^{F96W-N127W}</i>	53,14 мг/л (колбы)	(Pingpin <i>g et al.</i> , 2020)
		YP, глюкоза, IPM	<i>S. cerevisiae</i> YXWP-113	<i>tHMG1 IDI SKIK~t67OMcLIS^{E343D-}</i> <i>E352H~RIAD ScERG20^{F96W-}</i> <i>N127W~RIDD</i>	80,9 мг/л	(Zhou <i>et</i> <i>al.</i> , 2021)
		Дрожжевой экстракт, глюкоза, IPM, цитрат	<i>Pantoea</i> <i>ananatis</i> SC17	$\Delta ampC::P_{tac}-ScPMK-ScMDV-ScIDI$ $\Delta ampH::P_{phoC}-mvaES \Delta PacrtEXYIB-$ $PacrtZ::P_{tac}-Mpmvk \Delta gcd AaLIS$ <i>AaLIS</i> слитая с β -лактамазой из <i>Chromohalobacter sp. 560</i> присоединенной к гексагистидину и <i>ispA</i>	S-Линалоол: 10,9 г/л (1 л биореактор)	(Nitta <i>et</i> <i>al.</i> , 2021)
	Перилловая кислота	Среда Yeast Malt Broth, глюкоза, апельсиновое масло (89% лимонена), 25°C, pH 6.9	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 18942	Использован штамм без модификаций	872 мг/л (29,7% моль/моль)	(Jiang <i>et</i> <i>al.</i> , 2017)

	Гераниол	YP, глюкоза, этанол, IPM	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C	<i>IDI 2xtHMG1 t3CrGES-ScERG20^{F96W-N127W} ScERG20^{F96W-N127W}</i>	1,7 г/л (2 л биореактор)	(Jiang <i>et al.</i> , 2017)
Сескви-терпены (C15)	α-Фарнезен	YP, олеиновая кислота	<i>Y. lipolytica</i> PO1f	<i>AtoB HMG1 HMGS1 IDI 2xERG12 GGS1 ERG8 ERG19 3xFS-ERG20 VHb</i>	10,2 г/л (5 л биореактор)	(Liu <i>et al.</i> , 2021b)
		YP, глюкоза, додекан	<i>S. cerevisiae</i> YPH499	<i>HMG1 Fss0 Δdpp1</i>	10,4 г/л (5 л биореактор)	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
	β-Фарнезен	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ST6512	<i>HMG1 ERG12 ACL1 Seacs IDI ERG20 BFS</i>	955 мг/л (пробирки)	(Arnesen <i>et al.</i> , 2020)
		YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>ERG8 ERG12 ERG19 ERG13 ERG20 ERG1 IDI 3xtHMG1 BFS Δdga1 Δdga2</i>	22,8 г/л (2 л биореактор)	(Shi <i>et al.</i> , 2021)
		Минеральные соли и витамины, тростниковый сироп	<i>S. cerevisiae</i> Y227	<i>ScERG10 ScERG13 SctHMG1 ScERG12 ScERG8 ScERG19 ScERG20 P_{MET3}-ScERG9 PDR3 BjHMGs Cathl AaFS ACS2 Zmpdc DzeutE Lmpk Ckpta Sphmg</i>	130 г/л (200000 л биореактор)	(Meado <i>ws et al.</i> , 2016)
		2x YT, глицерин, сухая сыворотка	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>AtoB SctHMG1 ScHMGS1 ScERG12 ScERG8 2xEcidi ScMVD1 2xispA AaFS</i>	4,7 г/л (7 л биореактор)	(Ding <i>et al.</i> , 2021)

α-Сантален	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	<i>CISTS ERG8 HMG1</i>	27,9 мг/л (5 л биореактор)	(Jia <i>et al.</i> , 2019)
Нооткатон, Валенсен	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	<i>CnVS CYP706M1 AtCPR1 tHMG1 ERG20</i>	Нооткатон: 978,2 мг/л. Валенсен: 22,8 мг/л (колбы)	(Guo <i>et al.</i> , 2018)
Валенсен	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 20460	<i>HMG1 ERG12 ACL1 Seacs IDI ERG20</i> ↓ <i>SQS CnVS</i>	113,9 мг/л (пробирки)	(Arnesen <i>et al.</i> , 2020)
	SD, глюкоза	<i>S. cerevisiae</i> BJ5464	<i>ScERG10 ScERG13 SctHMG1 ScERG12 ScERG8 ScERG19 ScERG20 IDI</i> ↓ <i>ScERG9 Δbts1 Δdpp1 Δlpp1 CnVS</i>	539,3 мг/л (3 л биореактор)	(Chen <i>et al.</i> , 2019a)
β-ионон	Гидролизат пищевых отходов, глюкоза, додекан	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>CarB CarRP PhCCD1 GPPS tHMG1 ERG8,10,12,13,19,20 Δpox3,4,5 IDI Bbpk Bspta PhCCD1^{K164L}</i>	4 г/л (колбы)	(Chen <i>et al.</i> , 2022b)
Бисаболен	YP, Mg ²⁺ , отработанное кулинарное масло	<i>Y. lipolytica</i> Po1g	<i>HMG1 GcABC-G1 α-AgBS β-ZoBS γ-HaBS</i>	α-бисаболен 973,1 мг/л β-бисаболен 68,2 мг/л γ-бисаболен 20,2 мг/л (колбы)	(Zhao <i>et al.</i> , 2021)
α-Бисаболол	YP глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1h	<i>3xMrBBS 4xtHMG1 ERG12 ERG19 ERG10 ERG13 IDI ERG8 ERG20</i>	4,4 г/л (5 л биореактор)	(Li <i>et al.</i> , 2021b)

		УР глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1h	<i>POT1 MrBBS tHMG1 ERG20 ↓SQS</i>	364,2 мг/л (колбы)	(Ma <i>et al.</i> , 2021b)
	Аморфадиеи	УР глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1g	<i>2xAaADS tHMG1 ERG12 PAT1 POT1</i>	171,5 мг/л (колбы)	(Marsafari <i>et al.</i> , 2020)
Дитерпены (C20)	Милтирадиен	УР, глюкоза, додекан	<i>S. cerevisiae</i> YJ2X	Диплоидный штамм MAT α <i>BTS1-ScERG20 SmKSL1-SmCPS SctHMG1</i> в сочетании с MAT α	365 мг/л (15 л биореактор)	(Zhou <i>et al.</i> , 2012)
		УР, глюкоза, додекан	<i>S. cerevisiae</i> S288C	<i>BTS1-ScERG20 SaGGPS SctHMG1 rox1Δ Scerg9::Δ-218-175 tSmKSL1-CfTPS1</i>	550,7 мг/л (колбы) и 3,5 г/л (5 л биореактор)	(Hu <i>et al.</i> , 2020)
	Ферругинол	УР, глюкоза, додекан	<i>S. cerevisiae</i> WAT11U	<i>AtCPR1 BTS1-ScERG20 SmKSL1-SmCPS CYP76A11 SmCPR1</i>	10,5 мг/л (колбы)	(Guo <i>et al.</i> , 2013)
Тритерпены (C30)	Кампестерол	УР, масло семян подсолнечника	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	<i>Δerg5 DrDHCR7 POX2</i>	942 мг/л (5 л биореактор)	(Zhang <i>et al.</i> , 2017a)
	Гинсенозид К	УР, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	<i>tHMG1 ERG20 SQS PgDS PgPPDS AtATR1 PgUGT1</i>	161,8 мг/л (5 л биореактор)	(Li <i>et al.</i> , 2019)
	Олеаноловая кислота	УР, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	<i>tHMG1 ERG20 SQS ERG1 ERG9 GgBAS MtCYP716A12-AtATR1</i>	540,7 мг/л (5 л биореактор)	(Li <i>et al.</i> , 2020b)

Бетулиновая кислота	YP, глюкоза, IPM	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	<i>ERG1 SQS HMG1 RcLUS BPLO</i> <i>LjCPR MFE1</i>	204,9 мг/л (колбы)	(Jin <i>et al.</i> , 2019)
Сквален	YP, глюкоза, ацетат, цитрат, тербинафин	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>HMG1 DGA1</i>	731,2 мг/л (колбы)	(Tang <i>et al.</i> , 2021)
	YP, глюкоза, после полного потребления глюкозы – этанол	<i>S. cerevisiae</i> BY4741	НОΔ:: <i>tHMG1</i> <i>ScIDI</i> <i>DPP1Δ::ScERG20 ScERG9 ScMVD1</i> <i>ScERG10 ScERG13 LPP1Δ::ERG8</i> <i>ScERG12 NADH-HMG1 Dzada ADH2</i>	9,5 г/л (5 л биореактор)	(Li <i>et al.</i> , 2020c)
	2 YT, глицерин	<i>E. coli</i> DH5α	<i>SpmvaK1 SpmvaD SpmvaK2 Ecidi</i> <i>EfmvaE EfmvaS ispA tScERG9 tsr</i>	612 мг/л (колбы)	(Meng <i>et al.</i> , 2020)
Лупеол	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	<i>Δpah1 Δdgk1 HMG1 ERG9 ERG1</i> <i>OLE1 RcLUS</i>	411,7 мг/л (колбы)	(Zhang <i>et al.</i> , 2020b)
2,3-Окси-сквален	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 20460	<i>HMG1 ERG12 ↓ERG7 ACL1 Seacs IDI</i> <i>ERG20 SQS SQE</i>	22 мг/л (глубоколуночный планшет)	(Arnesen <i>et al.</i> , 2020)
Протопанаксадиол	YP, ксилоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	<i>SsXYL1 SsXYL2 ScXKS1 PgDS</i> <i>PgPPDS-AtATR1 tHMG1 ERG20 SQS</i> <i>TKL TAL TX, Δpox1,2,3</i>	300,6 мг/л (5 л биореактор)	(Wu <i>et al.</i> , 2019)

Тетра- тер- пены (С40)	Ликопин	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>XdCrtE CarB CarRP^{E78K} ERG12</i> <i>tHMG1 ERG20 IDI CK IPK</i>	17,6 г/л и 313 мг/г сухого веса (3 л биореактор)	(Ma <i>et al.</i> , 2022)
		YNB, галактоза, CSM, линолевая кислота	<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>Dwcrte DwcrteB DwcrteI</i>	10,1 мг/г сухого веса (колбы)	(Xu <i>et al.</i> , 2021)
		YP, глюкоза, этанол	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1D	<i>tHMG1 PacrtB 2xBtCrtI 2xTmCrtE</i> <i>ADH2 Seacs ALD6 PAH1 DGA1</i> <i>ACC1^{S659A-S1157A} OLE1</i>	2,4 г/л и 73,3 мг/г сухого веса (7 л биореактор)	(Ma <i>et al.</i> , 2019)
		LB, IPTG	<i>E. coli</i> K-12	<i>dxs Ecidi ispD ispF Ehcrte EhcrteI</i> <i>EhcrteB</i>	448 мг/г сухого веса (планшет)	(Cousse ment <i>et al.</i> , 2017)
	β-Каротин	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> MYA2613	<i>Δpox3,4,5,6 IDI ERG10 ERG12</i> <i>ERG13 CarB 5xCarRP 3xtHMG1</i> <i>2xGGS1</i>	4,0 г/л (2 л биореактор)	(Gao <i>et al.</i> , 2017)
		YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>Δpox2,3 ERG13 2xCarB 3xCarRP</i> <i>HMG1 GGS1</i>	4,5 г/л (5 л биореактор)	(Zhang <i>et al.</i> , 2020c)
		YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 20460	<i>Δpox1,2,3,4,5,6 TGL4 DGA2 GPD1</i> <i>CarB CarRP HMG1 GGS1</i>	6,5 г/л (5 л биореактор)	(Larroud e <i>et al.</i> , 2018)

	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>SaGGPPS CarB CarRP^{Y27R} ERG12</i> <i>tHMG ERG20 IDI CK IPK</i>	39,5 г/л (3 л биореактор)	(Ma <i>et al.</i> , 2022)
	Verduyn medium, ксилоза	<i>S. cerevisiae</i> D452-2	Δ <i>dld6 SsXYL1 SsXYL2 ScXKS1</i> <i>XdCrtYB XdCrtI XdCrtE</i>	772,8 мг/л (3 л биореактор)	(Sun <i>et al.</i> , 2020)
	Минеральная среда с мясным экстрактом, глюкоза, глицерин	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>ScERG12 ScERG8 ScERG19 ScIDI</i> <i>EfmvaE EfmvaS Bsdxs Bsfni AgGPPS2</i> <i>EhertE EhertB EhertI EhertY</i>	3,2 г/л (5 л биореактор)	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
Астаксантин	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> GB20	<i>XdCrtYB XdCrtI HMG1</i> \downarrow <i>SQS XdCrtE</i> <i>PscrtW PacrtZ</i>	54,6 мг/л, 3,5 мг/г сухого веса (планшет)	(Kildegaard <i>et al.</i> , 2017)
	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> GB20	<i>XdCrtYB XdCrtI HMG1</i> \downarrow <i>SQS XdCrtE</i> <i>SsGGPPS HpBKT HpCrtZ</i>	285 мг/л, 6 мг/г сухого веса (1 л биореактор)	(Tramontin <i>et al.</i> , 2019)
	YAG (глюкоза)	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>tHMG1 GGS1 CarRP CarB</i> много копий <i>HpBKT-RIDD</i> , много копий <i>HpCrtZ-RIAD</i>	3,3 г/л (5 л биореактор)	(Zhu <i>et al.</i> , 2022)
	YP (100 г/л пептона, 50 г/л дрожжевого экстракта), глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>PscrtW-HpCrtZ-SKL PscrtW-HpCrtZ-</i> <i>oleosin PscrtW-HpCrtZ-KDEL</i> <i>SaGGPPS CarRP CarB</i>	858 мг/л (3 л биореактор)	(Ma <i>et al.</i> , 2021a)

		YP, глюкоза	<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>XdCrtE</i> ^{C81T-A908G} 2x <i>XdCrtI</i> 3x <i>XdCrtYB</i> <i>tHMG1</i> 2x <i>HpCrtZ</i> ^{L288R} <i>OBKTM29</i>	446,4 мг/л (5 л биореактор)	(Li <i>et al.</i> 2022)
		YP, глицерин, уксусная кислота	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>PacrtE PacrtY PacrtB PacrtI</i> много копий <i>BscrtW</i> ^{A6T-T105A-L239M} <i>PagcrtZ</i>	880 мг/л (7 л биореактор)	(Li <i>et al.</i> , 2020a)
	Кантаксантин	YP, глюкоза	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>CarB CarRP GGS1 BscrtW</i>	36,1 мг/л и 4,0 мг/г сухого веса (колбы)	(Cui <i>et al.</i> , 2021)
		YP, глюкоза	<i>S. cerevisiae</i> BY4741	2x <i>XdCrtE</i> ^{C81T-A908G} 2x <i>XdCrtI</i> 4x <i>XdCrtYB SctHMG1 OBKTM29</i> <i>PM</i> ^{SeV-C} - <i>OBKTM29 PDR3 GAL4M9</i>	1,4 г/л (5 л биореактор)	(Chen <i>et al.</i> 2022a)
		Plackett–Burman композиция солей, глюкоза	<i>E. coli</i> MG1655	<i>Ecidi dxs dxr PacrtE PacrtB PacrtI</i> <i>PancrtY ipiHP1 AvcrtW ΔpykA</i>	153 мг/л (колбы)	(Scaife <i>et al.</i> , 2012)

*Здесь и далее:

- перечисленные в данной колонке нативные гены обозначают их сверхэкспрессию;
- знак «Δ» рядом с геном обозначает делецию гена (например, *Δdpp1*);
- прописная и строчная буквы перед геном обозначают название рода и вида (например, *CILS* - *Citrus limon LS*);
- цифра и знак «x» перед геном, (например, *2xtHMG1*) обозначает количество введенных копий генетических конструкций;
- первая буква «t» в названии гена обозначает урезанную конструкцию гена (например, *tHMG1*);
- знак «↓» перед геном обозначает снижение уровня его экспрессии (например, *↓SQS*).

1.3.1. Способы биотехнологического производства веществ класса монотерпенов

Низкомолекулярные липофильные летучие углеводороды, составляющие класс монотерпенов, в основном встречаются в растениях. Некоторые монотерпены обнаружены в морских организмах, например, галомон из красных водорослей *Portieria hornemannii*, который является потенциальным противоопухолевым средством (Fuller *et al.*, 1992). Класс монотерпенов насчитывает более 500 соединений, и их число продолжает увеличиваться в связи с открытием новых представителей данного класса (Племенков *и др.*, 2006), а также за счет внесения химических модификаций в природные вещества, что является важным методом получения новых биологически активных соединений (Zielinska-Blajet *et al.*, 2020).

В таблице 1 представлены способы создания продуцентов некоторых представителей класса монотерпенов, таких как лимонен, α -пинен, линалоол, перилловая кислота и гераниол. Гераниол имеет аромат роз и присутствует в более, чем 250 эфирных маслах. Гераниол используют в коммерческих целях в качестве ароматизатора в косметических и бытовых продуктах (Maczka, 2020). Данное вещество также проявляет антимикробные, антиоксидантные и противовоспалительные свойства. Кроме того, многочисленные исследования *in vitro* и *in vivo* показали активность гераниола против рака простаты, кишечника, печени, почек и кожи. Он может вызывать апоптоз и увеличивать экспрессию проапоптотических белков. Исследователям во главе с Jiang G. Z. удалось с помощью оптимизации мевалонатного пути, экспрессии мутантного аллеля фарнисилдифосфатсинтазы $ERG20^{F96W-N127W}$, а также слитых генов геранилдифосфатсинтазы *CrGES Catharanthus roseus* с $ERG20^{F96W-N127W}$ получить на *S. cerevisiae* титр 1,68 г/л гераниола в биореакторе (таблица 1).

Линалоол содержится в эфирных маслах более 200 видов растений (Pereira *et al.*, 2018). Линалоол используется как ароматизатор и консервант во многих косметических средствах. Данное вещество входит в состав 70% всех терпеноидных цветочных ароматов (Cao *et al.*, 2017). Линалоол общепризнан FDA как безопасный ароматизатор, считается безопасным в качестве ингредиента в косметике, получил статус GRAS в качестве синтетического вкусового вещества и добавки в пищевых продуктах для человека, а также в качестве ингредиента в медицине и пищевых продуктах для животных (Naque *et al.*, 2021). В медицинской отрасли линалоол выступает в качестве нестероидных противовоспалительных препаратов и имеет противовоспалительные, противомикробные, противогрибковые, антигиперлипидемические, антидепрессивные, нейропротекторные и противораковые свойства. Этот летучий компонент является прекурсором в биосинтезе витамина E (Kamatou *et al.*, 2008). Существует два энантиомера линалоола, S-(+)- и R-(-)-линалоол, отличные по своим свойствам (рисунок 3). Так, R-(-)-линалоол имеет запах, напоминающий лаванду, в то время как S-(+)-линалоол имеет

цитрусовый аромат (Ozek *et al.*, 2010). Более распространен в природе (R)-линалоол, однако, интенсивность запаха (S)-линалоола примерно в девять раз сильнее, чем у (R)-формы (Soulimani *et al.*, 2020).

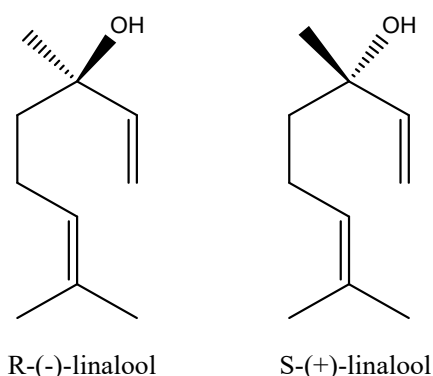


Рисунок 3. Химическая структура энантимеров линалоола: R-(-)-линалоол и S-(+)- линалоол.

Наиболее значимый результат в области конструирования штаммов-продуцентов линалоола был получен на бактериях *Pantoea ananatis* (Nitta *et al.*, 2021). Авторами во главе с Nitta был сконструирован генетически модифицированный штамм, несущий гены ацетил-КоА ацетилтрансферазы/гидроксиметил-КоА редуктазы *mvaE* и гидроксиметилглутарил-КоА синтазы *mvaS* из *Enterococcus faecalis*, инактивирован нативный оперон *crtEXYIB-crtZ*, контролирующей синтез каротиноидов, введен ген мевалонаткиназы *mvk* *M. paludicola*, делегирован нативный ген глюкозодегидрогеназы *gcd*, экспрессированы ген линалоолсинтазы *AaLIS* *Actinidia arguta* и линалоолсинтазы *A. arguta*, слитой с β -лактамазой из *Chromohalobacter* sp. 560 с гексагистидином на N-конце, повышающей растворимость фермента в организме хозяина. В этом же исследовании при скрининге линалоолсинтаз было выявлено, что *AaLIS* *A. arguta* оказывает наибольшее положительное влияние на продукцию линалоола (Hoshino *et al.*, 2020). В периодической «двухфазной» ферментации в ферментере с подпиткой, которая была разделена на фазу роста и последующую фазу продукции, сконструированный штамм накапливал 10,9 г/л (S)-линалоола. Однако, стоит отметить, что бактерии *P. ananatis* являются патогенными для сельскохозяйственных культур и лесных пород деревьев, а также способны инфицировать человека (Coutinho *et al.*, 2009).

Максимальный титр линалоола, описанный в литературе на рекомбинантных штаммах *Y. lipolytica* при ферментации в колбах, составляет 6,96 мг/л (Сао *et al.*, 2017). Для этого был оптимизирован мевалонатный путь синтеза с помощью сверхэкспрессии нативных генов 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы *HMG1*, изопентенилдифосфат дельта-изомеразы *IDII* и мутантного аллеля фарнезилдифосфатсинтазы с двумя аминокислотными заменами *ERG20^{F88W-N119W}*, а также экспрессирован ген линалоолсинтазы *AaLIS* *A. arguta*. На дрожжах *S.*

cerevisiae P. Zhou с соавторами был достигнут уровень продукции линалоола в 80,9 мг/л (Zhou *et al.*, 2021). Это было достигнуто аналогичной оптимизацией мевалонатного пути, за исключением использования усеченного, а не полного, как в предыдущей работе, аллеля *tHMG1*, а также экспрессией усеченного аллеля линалоолсинтазы *Mentha citrata* с аминокислотными заменами *t670McLIS^{E343D-E352H}* и *ERG20^{F88W-N119W}*, слитых с короткими пептидными метками (RIAD и RIDD, соответственно). Последние вызывают образование комплекса двух ферментов с высокой аффинностью связывания.

Лимонен содержится более чем в 300 видах растений и некоторых бактериях (Jongedijk *et al.*, 2016; Guneser *et al.*, 2017). Он используется в качестве вкусовой и ароматической добавки в пищевых продуктах и косметике. Лимонен может выступать в роли сырья для ряда коммерчески ценных продуктов, таких как фармацевтические препараты, нутрицевтики, биоматериалы и биотопливо (Li *et al.*, 2021a). Еще одним видом применения лимонена является использование его в качестве натурального и экологически чистого моющего средства в авиации, полиграфии, машиностроении и электронных устройствах. В связи с расширяющимся спектром применений в настоящее время мировое производство лимонена растет значительными темпами, и ожидается, что к 2024 году его рыночная стоимость вырастет до 1,9 млрд долларов США (Li *et al.*, 2021a). Наиболее значимый результат в генетической инженерии представлен продукцией лимонена с титром 3,63 г/л в биореакторе, полученной с использованием *E. coli* (Rolf *et al.*, 2020). Такой результат был достигнут путём воссоздания мевалонатного пути с помощью введения ряда оптимизированных генов *Abies gruis* и *S. cerevisiae* и усеченной версии лимоненсинтазы *tMsLS Mentha spicata*.

Среди дрожжей на *Y. lipolytica* показано получение наиболее высокого титра α -пинена, широко используемого в парфюмерии, медицине и в топливной промышленности (Wei *et al.*, 2021). Интересно отметить, что природные изоляты *Y. lipolytica* способны модифицировать лимонен до перилловой кислоты, являющейся противораковым и иммуномодулирующим средством (Tarrin *et al.*, 2017).

Общей схемой биосинтеза монотерпенов на микроорганизмах является получение по MVA- или MEP-пути предшественника – геранилдифосфата (GPP) с последующим превращением его в заданный монотерпен при помощи широкого спектра разнообразных синтаз (таблица 1). Наивысший титр лимонена (Rolf *et al.*, 2020) и α -пинена (Niu *et al.*, 2018) на *E. coli* удалось получить за счет воссоздания MVA-пути. На штамме *P. ananatis*, лучшем продуценте линалоола, зарегистрировано повышение титра (S)-линалоола в 1,4 раза при увеличении потока углерода через MVA-путь по сравнению с штаммом без введенного MVA-пути (Nitta *et al.*, 2021). При использовании стратегии по оптимизации нативного MVA-пути получен штамм *S. cerevisiae*

сверхпродукт гераниола (Jiang *et al.*, 2017). Приведенные данные указывают на перспективность использования MVA-пути для синтеза монотерпенов. Часто синтез монотерпенов конкурирует с дальнейшим синтезом фарнезилдифосфата (FPP) из которого, в свою очередь, происходит образование эргостерола, входящего в состав цитоплазматической мембраны дрожжей, а также других соединений, таких как сквален и убихиноны (Jorda *et al.*, 2020; Kildegaard *et al.*, 2017). По этой причине стратегия инактивации генов, контролирующей синтез FPP, для ослабления конкурентного пути не представляется возможной. Эффективными являются стратегии по отведению потока углерода с помощью модификации гена *ERG20* (*ERG20^{F96W-N127W} S. cerevisiae* (Pingping *et al.*, 2020); *ERG20^{F88W-N119W} Y. lipolytica* (Cao *et al.*, 2017)) или экспрессии геранилдифосфатсинтазы (*AgGPPS2* (Wang *et al.*, 2020a), приводящих к образованию GPP, а также уменьшение активности промотора скваленсинтазы *SQS* (Arnesen *et al.*, 2020) или *ERG20* (Chen *et al.*, 2019b) в целях ослабления конкурентного пути.

1.3.2. Способы биотехнологического производства веществ класса тетратерпенов

Тетратерпены и тетратерпеноиды с числом атомов углерода C40, получаемые из фитоена, часто называют каротиноидами. В связи со своей конденсированной структурой они имеют максимум поглощения в области синего и зеленого света и имеют окраску от желтого до красного. На сегодняшний день больше 1100 таких соединений обнаружено у многих видов бактерий, эукариот и некоторых архей (Yabuzaki, 2017).

В связи с требованиями рынка к безопасности пищевых продуктов спрос на каротиноиды из природных источников заметно растет, что вызывает развитие современных биотехнологий их производства. По сравнению с использованием растительных каротиноидов, производство каротиноидов на базе микроорганизмов может быть более эффективным, так как потенциально имеет меньшую стоимость и не зависит от сезонных, климатических и региональных условий (Ren *et al.*, 2021). Также микробиологический синтез позволяет получить больше продуктов с заданными свойствами, чем химический синтез, благодаря регио- и стереоселективности ферментов. Однако, рынок каротиноидов по-прежнему в основном занимают химически синтезированные продукты (80–90%), при значительно меньшей доле природных источников (10–20%) (Saini *et al.*, 2018). Таким образом, использование высокопродуктивных штаммов микроорганизмов для производства каротиноидов вызывает большой интерес.

Одним из наиболее востребованных каротиноидов является β -каротин. Благодаря своей высокой биоактивности, β -каротин широко используется в пищевой, кормовой, косметической и

медицинской промышленности. В организме человека β -каротин преобразуется в ретинол – незаменимый жирорастворимый витамин, который не может синтезироваться организмом человека и должен поступать с пищей (Zinder *et al.*, 2019). Среди каротиноидов, структура которых идентична молекуле ретинола, β -каротин проявляет самую высокую биоактивность в качестве предшественника витамина А (Bogacz-Radomska *et al.*, 2018). Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) было одобрено использование β -каротина в качестве питательной добавки и в составе детских смесей как источника витамина А (<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1245>).

На *S. cerevisiae* был сконструирован штамм-продуцент β -каротина с помощью сверхэкспрессии ряда генов пути утилизации ксилозы, а также гетерологичных генов пути биосинтеза β -каротина: *XdCrtYB*, *XdCrtI* и *XdCrtE* *Xanthophyllomyces dendrorhous*, кодирующих бифункциональную фитоенсинтазу/ликопинциклазу, фитоендесатуразу и геранилгеранилдифосфатсинтазу, соответственно (Sun *et al.*, 2020) (таблица 1). При культивировании полученного штамма в биореакторе на среде Verduyn medium с витаминами и витаминоподобными субстанциями (Verduyn *et al.*, 1992), а также с использованием ксилозы в качестве источника углерода был достигнут титр β -каротина 772,8 мг/л.

Xin-Kai Zhang с соавторами на *Y. lipolytica* с помощью интеграции генов *CarB* и *CarRP* *Mucor circinelloides*, кодирующих бифункциональную фитоенсинтазу/ликопин- β -циклазу (*carRP*) и фитоендегидрогеназу (*carB*), повышения экспрессии нативного гена *GGS1*, кодирующего геранилгеранилдифосфатсинтазу и усиления мевалонатного пути достигли продукции β -каротина, равной 408,0 мг/л при культивировании в колбах и 4,5 г/л при ферментации в 5-литровом биореакторе с непрерывной подачей глюкозы в качестве источника углерода (Zhang *et al.*, 2020c).

В работе Sh. Gao и соавторов был проведен анализ влияния увеличения числа копий генов на продукцию β -каротина на *Y. lipolytica* (Gao *et al.*, 2017). Среди рассмотренных генов *CarB*, *CarRP*, *tHMG1*, *GGS1* на продукцию наиболее сильно повлияла сверхэкспрессия генов *CarRP*, *tHMG1* и *GGS1* (расположены в порядке уменьшения влияния). В связи с этим, был сконструирован штамм с мультикопийной интеграцией описанных генов, внесением одной копии гена *CarB* и усилением мевалонатного пути. Данный штамм продуцировал 4,0 г/л при ферментации в 2-литровом биореакторе.

Коллективом во главе с R. Ledesma-Amaro было обнаружено, что штамм *Y. lipolytica* с повышенным содержанием липидов был способен накапливать больше β -каротина по сравнению

с диким. Полученный штамм, несущий гены *HMG1*, *GGSI*, *CarB*, *CarRP* и способный к сверхнакоплению липидов продуцировал 6,5 г/л β -каротина в 5-литровом биореакторе (Larroude *et al.*, 2018).

Недавним открытием стало описание феномена субстратного ингибирования ликопин- β -циклазы как основного ограничивающего фактора биосинтеза каротиноидов на *Y. lipolytica* (Ma *et al.*, 2022). Были получены два аллеля *CarRP*, кодирующего бифункциональный фермент фитоенсинтазу/ликопин- β -циклазу: *CarRP*^{Y27R} и *CarRP*^{E78K}, которые либо приводили к снятию субстратного ингибирования ликопин- β -циклазы и получению высокого титра β -каротина (*CarRP*^{Y27R}), либо, наоборот, к остановке синтеза на этапе получения ликопина (*CarRP*^{E78K}). Так, используя данную стратегию, а также в результате интеграции *CarB*, *XdCrtE* *X. dendrorhous*, кодирующего геранилгеранилдифосфатсинтазу, модификации генов мевалонатного пути и пути утилизации изопентанола были получены наиболее высокие титры ликопина 17,6 г/л и β -каротина 39,5 г/л в 3-литровом биореакторе.

Ликопин широко используется в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности в связи с сильными противораковыми, противовоспалительными и антиоксидантными свойствами (Wang *et al.*, 2020c). До описания феномена субстратного ингибирования ликопин- β -циклазы для синтеза ликопина стандартной стратегией являлась экспрессия ряда генов, продукты которых не обладают ликопин- β -циклазной активностью. Это могли быть *EhcrtE*, *EhcrtB* и *EhcrtI* *Erwinia herbicola*, кодирующие геранилгеранилдифосфатсинтазу, фитоенсинтазу и фитоендегидрогеназу, соответственно, как в случае штамма *E. coli*, продуцирующего 448 мг/г сухого веса ликопина при культивировании в малых объемах (Coussement *et al.*, 2017). Или же, например, *TmCrtE* *Taxus x media*, кодирующего геранилгеранилдифосфатсинтазу, *PacrtB* *Pantoea agglomerans*, кодирующего фитоенсинтазу, *BtCrtI* *Blakeslea trispora*, кодирующего фитоендесатуразу в случае штамма *S. cerevisiae*, продуцирующего ликопин 2,37 г/л и 73,3 мг/г сухого веса в 7-литровом биореакторе (Ma *et al.*, 2019).

Астаксантин - это природный каротиноидный пигмент с высокой коммерческой ценностью. Общий объем мирового рынка в 2019 году оценивался приблизительно в 1 млрд долларов США и, как ожидается, вырастет почти до 3,4 млрд долларов США к 2027 году (Kumar *et al.*, 2022). Астаксантин демонстрирует превосходные антиоксидантные свойства, которые в 1000 раз выше, чем у витамина Е, в 200 раз выше, чем у полифенолов чая и в 10 раз выше, чем у других каротиноидов, таких как лютеин, кантаксантин, β -каротин, зеаксантин (Patel *et al.*, 2022). В настоящее время большая часть коммерческого астаксантина синтезируется химическим путем посредством двойной реакции Виттига (Stachowiak *et al.*, 2021). В результате получается

рацемическая смесь стереоизомеров (3S,3'S), (3R,3'S) и (3R,3'R) в соотношении приблизительно 1:2:1 (Moretti *et al.*, 2006). Такой синтетический астаксантин используется главным образом в качестве пигмента-добавки к кормам в аквакультуре для усиления розовой окраски мяса, лосося, креветок, ракообразных и декоративных рыб (Higuera-Ciarama *et al.*, 2006). Однако, несмотря на отсутствие убедительных доказательств, подтверждающих различную интенсивность биологической активности каждого стереоизомера (Gross *et al.*, 2005; Liu X. *et al.*, 2016), химически синтезированный астаксантин не был одобрен для потребления человеком из-за возможных побочных эффектов, связанных с присутствием токсичных примесей (Capelli *et al.*, 2013). Поэтому возрастает интерес к получению природного астаксантина, разрешенного для потребления человеком (Patil, 2022). Известно, что природный астаксантин, извлеченный, например, из микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, является основным пригодным для потребления человеком источником для пищевых добавок, косметики и продуктов питания (Davinelli, 2018). И все же стоит отметить, что на долю синтезированного химическим путем астаксантина приходится 95% рынка и его синтез требует более низких производственных затрат (около 1000 долларов США/кг), чем альтернативное извлечение астаксантина из водорослей, на долю которого приходится <1% рынка (Panis *et al.*, 2016).

Командой авторов был получен штамм *E. coli* способный к продукции 880 мг/л астаксантина в 7-литровом биореакторе (Li *et al.*, 2020a). Для этого были введены гетерологичные гены, необходимые для синтеза β -каротина из *Pantoea ananatis* (*crtEBIY*), а также β -каротингидроксилаза (*crtZ*) из *Pantoea agglomerans* и мутантный аллель *crtW* *Brevundimonas* sp. с аминокислотными заменами A6T, T105A и L239M, кодирующий β -каротинкетотазу.

Наилучший на данный момент результат в накоплении астаксантина на дрожжах *S. cerevisiae* продемонстрировали Min Li с соавторами. Полученный штамм продуцировал 446,4 мг/л астаксантина в 5 литровом биореакторе (Li *et al.*, 2022). В сверхпродуцирующей липиды штамм были введены ген *tHMG1*, мутантные аллели *OBKTM29* (*HpBKT^{H165R-V264D-F298Y-M1T-N188D-L271R}*) и *HpCrtZ^{L288R}* *H. pluvialis*, кодирующие β -каротинкетотазу и β -каротингидроксилазу, соответственно, *XdCrtE^{C81T-A908G}* *Xanthophyllomyces dendrorhous*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу и ген *XdCrtYB* *X. dendrorhous*, кодирующий бифункциональную фитоенсинтазу/ликопинциклазу. Чтобы сбалансировать конкурирующие метаболические потоки, приводящие к росту клеток и синтезу продукта, путь биосинтеза астаксантина был помещен под контроль Gal4M9-опосредованной температурно-чувствительной системы регуляции, а ферментация была разделена на две фазы. Первую фазу культивирования с подпиткой использовали для быстрого роста биомассы, а вторую – для активного накопления продукта.

Y. lipolytica является перспективным штаммом для создания продуцентов астаксантина. В первом сообщении об успешной инженерии *Y. lipolytica* для производства астаксантина был получен титр 54,6 мг/л астаксантина (3,5 мг/г сухого веса) за счет сверхэкспрессии нативных генов *HMG1* и *GGS1*, введения *XdCrtYB X. dendrorhous*, кодирующего бифункциональную фитоенсинтазу/ликопенциклазу и *XdCrtI X. dendrorhous*, кодирующего фитоендесатуразу, а также нескольких копий *PscrtW Paracoccus* sp. N81106 (β -каротинкеттолаза) и *PacrtZ P. ananatis* (β -каротингидроксилаза). Введение множественных копий *PscrtW* и, особенно, *PacrtZ* было ключевым для увеличения накопления астаксантина. Кроме того, подавлялась экспрессия *SQS1* (скаваленсинтазы), чтобы снизить использование промежуточных продуктов для биосинтеза сквалена (Kildegaard *et al.*, 2017). Позднее авторам удалось дополнительно повысить титр астаксантина до 285 мг/л (6 мг/г сухого веса) за счет увеличения потока углерода в направлении β -каротина благодаря введению дополнительной гетерологичной геранилгеранилдифосфат синтазы (*GGPPs7 Synechococcus* sp.) и замены ранее использованных генов *PscrtW* и *PacrtZ* на несколько копий *HpBKT* и *HpCrtZ H. pluvialis*, кодирующих β -каротинкеттолазу и β -каротингидроксилазу, соответственно. И снова количество копий последних генов оказало значительное влияние на конечный титр астаксантина (Tramontin *et al.*, 2019).

В недавнем исследовании в качестве исходного использовался штамм *Y. lipolytica* продуцент β -каротина, полученный путем интеграции генов *SaGGPPS Sulfolobus acidocaldarius*, *CarRP* и *CarB Mucor circinelloides* (Ma *et al.*, 2021a). Затем тестировали комбинации β -каротинкеттолаз (*BrcrtW Brevundimonas* sp., *HpBKT H. pluvialis*, *PscrtW Paracoccus* sp.) и β -каротингидроксилаз (*BrcrtZ Brevundimonas* sp., *HpCrtZ H. pluvialis*, *PacrtZ Pantoea ananatis*) и отобрали наилучшую комбинацию - *PscrtW* и *HpCrtZ*. Чтобы облегчить превращение β -каротина в астаксантин и свести к минимуму накопление промежуточных продуктов, таких как зеаксантин и кантаксантин, два фермента были объединены в один полипептид. Затем слитый ген был помечен сигнальными последовательностями, направляющими продукт в эндоплазматический ретикулум и пероксисомы, а также в липидные тела, которые представляют собой субклеточные структуры, в которых происходит синтез и хранение β -каротина. Культивирование полученного штамма YL17 позволило достичь титра астаксантина 858 мг/л (16,7 мг/г сухого веса) через 12 дней в колбах, но он был снижен до 453 мг/л (8,9 мг/г сухого веса) при попытке масштабировать культуру до 3-литрового биореактора. Совсем недавно, во время подготовки этой рукописи, Zhu и соавторы сообщили о стратегии слияния *HpCrtZ* и *HpBKT* с пептидами RIDD/RIAD, продемонстрированной на *Y. lipolytica* (Kang *et al.*, 2019) и последующей интеграции 20 копий каждого из модифицированных *HpCrtZ* и *HpBKT*. Эта стратегия позволила добиться титра астаксантина до 3,3 г/л (26,5 мг/г сухого веса) за 264 часов в 5-литровом биореакторе (Zhu *et al.*,

2022). Однако, этот процесс требовал непрерывной подачи сложных обогащенных сред, что делало его экономически невыгодным для коммерческого применения.

Ведутся разработки в области метаболической инженерии микроорганизмов с целью получения кантаксантина, который пользуется большим рыночным спросом в качестве добавки к кормам для животных, в частности для птиц, с объемом рынка в 75 миллионов долларов США (Chen *et al.* 2022a). На *Y. lipolytica* была продемонстрирована возможность получения данного каротиноида с титром 36,1 мг/л в колбах (Cui *et al.*, 2021) с помощью экспрессии описанных выше генов *CarRP* и *CarB* *Mucor circinelloides*, *GGSI*, *BscrtW*.

Наиболее ярким примером конструирования продуцента кантаксантина на *E. coli* является работа группы ученых во главе с Scaife 2012 года (Scaife *et al.*, 2012). В данной работе зарегистрирован титр около 150 мг/л кантаксантина при культивировании полученного штамма в колбах. Это было достигнуто за счет сверхэкспрессии нативных генов *Ecidi*, *dxs*, *dxr*, кодирующих изопентенилдифосфат-дельта-изомеразу, 1-дезоксид-ксилозу-5-фосфатсинтазу и 1-дезоксид-ксилозу-5-фосфатредуктазоизомеразу, соответственно, а также интеграции *ipiHP1* *H. pluvialis*, кодирующего изопентенилдифосфатизомеразу, *PacrtE*, *PacrtB* и *PacrtI* *P. agglomerans* кодирующих геранилгеранилдифосфатсинтазу, фитоенсинтазу и фитоендесатуразу, соответственно, *PancrtY* *P. ananatis*, кодирующую β-циклазу ликопина, *AvcrtW* *Anabaena variabilis*, кодирующего β-каротинкетотазу и делеции пируваткиназы *pykA*.

В работе (Chen *et al.* 2022a) был получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, способный накапливать кантаксантин. Штамм был получен с помощью экспрессии укороченного аллеля *tHMG1* *S. cerevisiae*, кодирующего 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу, мутантного аллеля *XdCrtE*, генов *XdCrtI* и *XdCrtYB* *Xanthophyllomyces dendrorhous*, гена *PDR3* *S. cerevisiae*, кодирующего фактор транскрипции, мутантного аллеля *OBKTM29* *Haematococcus pluvialis*, кодирующего β-каротинкетотазу (в том числе, с пептидом, заякоривающем белок в плазматической мембране). С помощью температурно-чувствительной системы GAL4M9 авторы контролировали путь синтеза для разнесения по времени фаз роста клеток и синтеза продукта. Полученный штамм продуцировал 19,2 мг/г сухого веса и 1,44 г/л кантаксантина за 250 часов двухэтапного культивирования в 5 литровом биореакторе на сложносоставных средах, содержащих пептон, дрожжевой экстракт, кукурузный экстракт, глюкозу и этанол и др.

Из выше изложенного (разделы 1.3.1 – 1.3.2) следует, что в большинстве случаев увеличение потока MVA-пути с помощью сверхэкспрессии контролируемых его генов является эффективной стратегией, значимо повышающей продукцию веществ терпенового ряда на рассмотренных модельных организмах (таблица 1). Наивысший уровень продукции всех

рассмотренных каротиноидов показан на дрожжах *S. cerevisiae* и *Y. lipolytica*, в том числе благодаря оптимизации экспрессии генов их нативного MVA-пути.

Ключевым ограничивающим скорость этапом MVA-пути считается образование мевалоната под действием фермента Hmg1 (3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы) из 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (Ashour *et al.*, 2010). В связи с этим большинство авторов рассмотренных работ прибегают к экспрессии полной или усеченной версии гена *HMG1*. На основе штамма *Y. lipolytica*, несущего сверхэкспрессированные нативные гены *tHMG1*, *ERG12*, кодирующего мевалонаткиназу и *ERG20*, кодирующего фарнезилдифосфатсинтазу, были получены наивысшие титры ликопина (17,6 г/л) и β -каротина (39,5 г/л) (Ma *et al.*, 2022). Однако, известно, что больший эффект на продукцию терпенов оказывает все же экспрессия полной, а не усеченной версии гена *HMG1*, как показано на примере конструирования продуцентов α -фарнезена, линалоола, лимонена, бетулиновой кислоты и β -каротина (Arnesen *et al.*, 2020). Стоит отметить, что положительное влияние от оптимизации мевалонатного пути наблюдается и в подходах к конструированию других классов терпенов. Так, сверхэкспрессия *HMG1* в сочетании с *ERG12* стократно (в мг/г сухого веса) увеличивала образование монотерпена лимонена, что свидетельствует о ключевой роли биосинтеза мевалоната и его последующего фосфорилирования в обеспечении усиленного потока углерода для улучшения производства метаболитов, связанных с путем MVA. (Cao *et al.*, 2016). Сверхэкспрессия *ERG20* с *tScHMG1* в *S. cerevisiae* повышала продукцию (+)-валентена на 109% (в мг/л) по сравнению с экспрессией только *tScHMG1* (Guo *et al.*, 2018).

На синтез каротиноидов существенное влияние оказывает экспрессия геранилгеранилдифосфатсинтаз. Показано, что экспрессия геранилгеранилдифосфатсинтазы *X. dendrorhous* (*XdCrtE*) приводила к 4-кратному увеличению титра β -каротина (Kildegaard *et al.*, 2017). Экспрессия *GGPPs7* из *Synechococcus* sp. приводила к увеличению накопления β -каротина на 272%, в то время как экспрессия второй копии геранилгеранилдифосфатсинтазы *XdCrtE* увеличивала титры β -каротина на 49% (Tramontin *et al.*, 2019). В работе во главе с Ма был проведен скрининг геранилгеранилдифосфатсинтаз из разных источников (Ma *et al.*, 2022). Накопление геранилгеранилдифосфата повышалось в ряду при экспрессии синтаз из ниже перечисленных организмов: *Taxus canadensis*, *P. agglomerans*, *Y. lipolytica*, *S. acidocaldarius* и *X. dendrorhous*. Самый высокий титр ликопина был получен при использовании геранилгеранилдифосфатсинтазы из *X. dendrorhous*. Однако, самый высокий титр β -каротина и соотношение β -каротина к ликопину по сравнению с другими ферментами GGPPS обеспечила SaGGPPS *S. acidocaldarius*. Авторы утверждают, что это было следствием снижения потока

углерода через реакцию, катализируемую SaGGPPS, что позволило избежать слишком быстрого накопления ликопина и, следовательно, предотвратить ингибирование субстратом.

Лучший титр каротиноидов β -каротина (в 51 раз выше, чем для *S. cerevisiae*), ликопина (в 7 раз выше, чем для *S. cerevisiae*) и астаксантина (в 4 раза выше, чем для *E. coli* и в 7 раз для *S. cerevisiae*) на сегодняшний день зарегистрирован на *Y. lipolytica*. Это может быть связано с исходно присущей способностью *Y. lipolytica*, в отличие от *S. cerevisiae*, накапливать большое количество предшественников каротиноидов и липидов – ацетил-КоА, а также со способностью образовывать липидные тела, способствующие хранению липофильных по своей природе каротиноидов (Larroude *et al.*, 2018). Другим преимуществом *Y. lipolytica* перед *S. cerevisiae* является возможность использовать более широкий спектр субстратов в качестве источников углерода (включая растительные масла и глицерин), что может быть важно при конструировании штамма продуцента каротиноидов в целях промышленного производства. Также получение терпеноидов, предназначенных для потребления человеком, с использованием *Y. lipolytica* считается безопасным в отличие от производства, основанного на бактериях *E. coli*.

2. Материалы и методы

2.1. Штаммы и среды

Штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q 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⁻ rfb-50 rph-1 λ [cI⁸⁵⁷Δ(cro-attR)] rpsL^{K43R}*) (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. Все полученные штаммы, использованные в этой работе, перечислены в таблице 2. Штаммы растили при 30 °C на минимальной среде YNB (Yeast Nitrogen Base, Himedia, каталожный номер G091) с калий-фосфатным буфером (pH 6,7) с конечной концентрацией 0,1 М. YNB с различными источниками углерода обозначали, как указано ниже: YNBSuc0.8 – YNB с добавлением 8 г/л сахарозы, YNBSuc – YNB с добавлением 10 г/л сахарозы, YNBSuc2 – YNB с добавлением 20 г/л сахарозы, YNBSuc10 – YNB с добавлением 100 г/л сахарозы, YNBD – YNB с добавлением 10 г/л глюкозы, YNBD2 – YNB с добавлением 20 г/л глюкозы, YNBCitr – YNB с добавлением 20 г/л цитрата, YNBSuc/Fru – YNB с добавлением 10 г/л сахарозы и 10 г/л D-фруктозы, YNBSuc/Man – YNB с добавлением 10 г/л сахарозы и 10 г/л D-маннита, YNBSuc/Sorb – YNB с добавлением 10 г/л сахарозы и 10 г/л D-сорбитола. В качестве богатой среды использовали YP – пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л (YPSuc2 – YP с добавлением 20 г/л сахарозы, YPSuc9 – YP с добавлением 90 г/л сахарозы, YPGly9 – YP с добавлением 90 г/л глицерина, YPD2 – YP с добавлением 20 г/л глюкозы, YPD9 – YP с добавлением 90 г/л глюкозы). 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.

Культивирование рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* для измерения накопления каротиноидов проводили в пробирках объемом 50 мл с рабочим объемом 10 мл в течение 5 суток при 30 °C на орбитальной качалке со скоростью 250 об/мин. Среда культивирования - YPSuc2+2+1 (10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 20 г/л сахарозы с последовательной подачей 20 г/л и 10 г/л сахарозы через 72 ч и 96 ч после начала культивирования, соответственно).

Инокулят выращивали в 5 мл YPSuc2 в течение 24 ч и переносили 0,1% (об./об.) в среду культивирования.

Также, культивирование рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* для измерения накопления линалоола проводили в колбах объемом 750 мл с рабочим объемом 50 мл в течение 5 или 7 суток при 28 °C на орбитальной качалке со скоростью 275 об/мин. Для этого использовали среду YPSuc9 (10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л пептона, 90 г/л сахарозы). На третьи сутки добавляли 5 мл изопропилмиристата (ITW Reagents, Германия). Инокулят выращивали в 5 мл YPSuc2 в течение 24 ч и переносили 0,1% (об./об.) в среду культивирования.

2.2. Конструирование штаммов

Сконструированные плазмиды и праймеры, использованные в этой работе, представлены в таблицах 3 и 4. Частота использования кодонов в последовательности гетерологичных генов была адаптирована для *Y. lipolytica* с использованием веб-инструмента оптимизации кодонов GenSmart™ (GenScript). Гены были получены из Twist Bioscience (Калифорния, США). Последовательности ДНК представлены в таблице 5. Все описанные плазмиды были сконструированы с использованием стандартных стратегий клонирования (Green, 2012), сборки Гибсона (Gibson *et al.*, 2009) и рекомбинации в клетках *E. coli* (Yuzbashev *et al.*, 2022). Детали конструирования описаны в таблице 3. Ферменты для манипуляций с ДНК были получены из Thermo Fisher Scientific (Вильнюс, Литва). Фрагменты ДНК, содержащие гены *Y. lipolytica*, области гомологии для хромосомной интеграции, промоторы и терминаторы амплифицировали с использованием ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase и геномной ДНК штамма W29 дикого типа (ATCC 20460) в качестве матрицы, если не указано иное. Все полученные конструкции были проверены секвенированием по обеим цепям ДНК.

Штаммы *Y. lipolytica* были сконструированы с помощью безмаркерной системы CRISPR-Cas9. Направляющая РНК (sgRNA) и Cas9 экспрессировали с помощью автономной плазмиды pCasNA-серии (Yuzbashev *et al.*, 2022) (таблица 3). Для репарации разрыва совместно с этой плазмидой трансформировали фрагмент ДНК, содержащий единицу транскрипции, фланкированную последовательностями, гомологичными целевому хромосомному локусу. Штаммы дрожжей трансформировали с использованием ацетата лития как описано в (Yuzbashev *et al.*, 2022). Трансформантов отбирали на агаризованной среде YPSuc2, содержащей 250 мкг/мл ноурсеотрицина. Рекомбинантов скринировали с помощью ПЦР с использованием пар праймеров (IntXX-chr-F и IntXX-chr-R, где XX – идентификатор целевого геномного локуса,

например, в случае IntA2-chr-F - локус IntA2), представленных в таблице 4. Вспомогательную плазмиду pCasNA удаляли путем пересева клеток на агаризованную среду YPSuc2 до отдельных колоний с последующим тестом методом реплик на средах с ноурсеотрицином и без него.

Набор вспомогательных плазмид для интеграции в локусы IntA1, IntA2, IntA4, IntB1, IntC4, IntD3, IntD4 и IntF14 содержал фланкирующие последовательности (IntUp и IntDn), гомологичные локусам на хромосомах *Y. lipolytica*, промоторы P_{TEF_{in}} и P_{EXPR1}, терминаторы T_{TEF} и T_{XHR2}, ориджин репликации (ARS) и маркер устойчивости к гигромицину (*Hyg*). Плазмиды были сконструированы с использованием метода сборки Гибсона из семи фрагментов (таблица 3). Все ПЦР-продукты амплифицировали из геномной ДНК штамма W29 дикого типа (ATCC 20460), за исключением гена устойчивости к хлорамфениколу (Cm), который амплифицировали из pMW-att-Cm (Taratynova *et al.*, 2021) с использованием праймеров Oligo035 и Oligo036.

Набор вспомогательных плазмид для интеграции в локусы IntB11, IntC13, IntC14, IntE6, IntE12 и IntF11 не содержал элементов ARS или *Hyg*. Гомологические фланки и внутренняя часть Prom_Term_hrGFP были синтезированы Twist Bioscience (таблица 5). Плазмиды конструировали методом Гибсона со стандартными векторами pUC19 (для локусов B11, C13, C14, E12) или pBR322 (для локуса E6), обработанными эндонуклеазами *EheI/HindIII* или *EcoRV/Eco52I*, соответственно (таблица 3).

Плазмиды pT-flIntE12-LIS, pT-flIntE16-LIS и pT-IntC14-LIS, содержащие кодон-оптимизированный синтетический ген *AaLIS* из *A. argute* (GenBank ID: GQ338153.1), кодирующий линалоолсинтазу, и плазида pT-IntC3-CrGPPS, содержащая кодон-оптимизированный ген *CrGPPS* из *C. roseus* (GenBank ID: JX417185.1), были получены из Twist Bioscience (Калифорния, США). Конструирование плазмид для интеграции в IntC2 и IntC13 проводили методом Golden Gate (Yuzbashev *et al.*, 2022). Экспрессионная плазида pC13US1.1-P_{TEF}-RAD52-T_{LIP}, содержащая оптимизированный по кононам для *Y. lipolytica* ген *RAD52* из *S. cerevisiae* (GenBank ID: CAA86623.1), а также плазида pE8UA2.2-P_{AraDH2}-CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1}-P_{TEF}-CarB-T_{LIP2} были сконструированы с использованием метода Golden Gate (таблица 3, 5).

Двухцепочечные фрагменты ДНК длиной 120 п.н. для внесения делеции гена *DGK1* и *PAH1* были получены путем отжига пар комплементарных одноцепочечных олигонуклеотидов Oligo106/Oligo107 и Oligo108/Oligo109 соответственно, как описано в протоколе отжига олигонуклеотидов (<https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/technical-documents/protocol/genomics/pcr/annealing-oligos>) (таблица 4). Полученные фрагменты для репарации разрыва в генах *DGK1* или *PAH1* котрансформировали совместно с вспомогательными плазмидами pCNR-sgDGK1d и pCNR-sgDGK1f или pCNR-sgPAH1a и pCNR-sgPAH1b, соответственно, в штаммы *Y. lipolytica* ВКПМ Y-3178, G0, G1 и G8 (таблица 2).

Запись в тексте с обозначением штамма родоначальника и перечислением генов, например, W29 (*Δpex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1*), обозначает интеграцию (*ACBP ZWF1 ACC1 DGA1*) или делецию (*Δpex10*) данных генов в штамме родоначальнике.

Таблица 2. Штаммы *Y. lipolytica*, используемые в этом исследовании.

Штамм	Генотип*	Родительский штамм	Интегрируемая кассета/плазмида	pCasНа-вспомогательная плазмида
ВКПМ Y-3178	W29 MATa	ATCC 20460	-	-
GY1	MATa <i>Δura3</i>	(Yuzbasheva et al., 2020b)		
GY2	MATa <i>Δacl2::URA3</i>	(Yuzbasheva et al., 2020b)		
GY3	MATa <i>Δacl2</i>	(Yuzbasheva et al., 2020b)		
ВКПМ Y-4620	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1</i>	(Taratynova et al., 2021)		
GBK1	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1</i>	(Taratynova et al., 2021)	-	-
GBK1/1	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 OsGGPPS1</i>	GBK1	pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>OsGGPPS1</i> -T _{TEF}	-
GBK1/2	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 SaGGPPS</i>	GBK1	pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>SaGGPPS</i> -T _{TEF}	-
GBK1/3	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 GGPPs7</i>	GBK1	pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>GGPPs7</i> -T _{TEF}	-
GBK1/4	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 ERG20^{F88C}</i>	GBK1	pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>ERG20^{F88C}</i> -T _{TEF}	-
GBK1/5	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 GGS1</i>	GBK1	pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>GGS1</i> -T _{TEF}	-
GBK2	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 IntF14::HMG1</i>	GBK1	IntF14-P _{TEFin} - <i>HMG1</i> -T _{TEF} (<i>SmiI</i>)	pCasNA-IntF14
GBK3	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12</i>	GBK2	IntD4-P _{TEFin} - <i>ERG12</i> -T _{TEF} (<i>SmiI</i>)	pCasNA-IntD4
GBK4	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP,CarB,GGS1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20</i>	GBK3	IntA2-P _{TEFin} - <i>ERG20</i> -T _{synt} (<i>SmiI</i>)	pCasNA-IntA2
GBK5	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20 IntC4::fusCarRP-GGPPs7</i>	GBK4	IntC4-P _{TEFin} - <i>CarRP-GGPPs7</i> -T _{TEF} (<i>SmiI</i>)	pCasNA-IntC4
GBK6	MATa <i>Δpex10 Δku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1</i>	GBK5	IntA4-P _{TEFin} - <i>CarRP</i> -	pCasNA-IntA4

	IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntC4:: <i>fusCarRP-GGPPs7</i> IntA4:: <i>fusCarRP-ERG20^{F88C}</i>		<i>ERG20^{F88C}-T_{TEF}</i> (<i>SmiI</i>)	
GBK7	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntC4:: <i>fusCarRP-GGPPs7</i> IntA4:: <i>fusCarRP-ERG20^{F88C}</i> IntB1:: <i>CarB</i>	GBK6	IntB1-P _{TEFin} - <i>CarB-T_{TEF}</i> (<i>SmiI</i>)	pCasNA- IntB1
GBK8	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>HpBKT</i>	GBK4	IntF11-P _{TEFin} - <i>HpBKT-T_{TEF}</i> (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntF11
GBK9	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>BvertW</i>	GBK4	IntF11-P _{TEFin} - <i>BvertW-T_{TEF}</i> (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntF11
GBK10	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>AsprtW</i>	GBK4	IntF11-P _{TEFin} - <i>AsprtW-T_{TEF}</i> (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntF11
GBK11	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>HpBKT</i> IntE6:: <i>AaCrtZ</i>	GBK8	IntE6-P _{TEFin} - <i>AaCrtZ-T_{TEF}</i> (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntE6
GBK12	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>HpBKT</i> IntE6:: <i>HpCrtZ</i>	GBK8	IntE6-P _{TEFin} - <i>HpCrtZ-T_{TEF}</i> (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntE6
GBK13	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntE6:: <i>fusHpBKT-HpCrtZ</i>	GBK4	IntE6-P _{TEFin} - <i>fusHpBKT- HpCrtZ-T_{TEF}</i> (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntE6
GBK14	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntE6:: <i>fusHpCrtZ-HpBKT</i>	GBK4	IntE6-P _{TEFin} - <i>fusHpCrtZ- HpBKT-T_{TEF}</i> (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntE6
GBK15	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>fusHpCrtZ-HpBKT</i>	GBK4	IntF11-P _{TEFin} - <i>fusHpCrtZ- HpBKT-T_{TEF}</i> (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntF11
GBK16	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>HpBKT</i> IntE6:: <i>HpCrtZ</i> IntC13:: <i>HpBKT</i>	GBK12	IntC13-P _{TEFin} - <i>HpBKT-T_{TEF}</i> (<i>SmiI</i>)	pCasNA- IntC13
GBK17	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>HpBKT</i> IntE6:: <i>HpCrtZ</i> IntC13:: <i>HpBKT</i> IntC14:: <i>HpBKT</i>	GBK16	IntC14-P _{TEFin} - <i>HpBKT-T_{TEF}</i> (<i>SmiI</i>)	pCasNA- IntC14
GBK18	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>HpBKT</i> IntE6:: <i>HpCrtZ</i> IntC13:: <i>HpBKT</i> IntC14:: <i>HpBKT</i> IntB11:: <i>HpCrtZ</i>	GBK17	IntB11-P _{TEFin} - <i>HpCrtZ-T_{TEF}</i> (<i>SmiI</i>)	pCasNA- IntB11
GBK19	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i> IntF11:: <i>HpBKT</i> IntE6:: <i>HpCrtZ</i> IntC13:: <i>HpBKT</i> IntC14:: <i>HpBKT</i> IntB11:: <i>HpCrtZ</i> IntE12:: <i>HpCrtZ</i>	GBK18	IntE12-P _{TEFin} - <i>HpCrtZ-T_{TEF}</i> (<i>SmiI</i>)	pCasNA- IntE12
GBK20	MATa Δ pex10 Δ ku70:: <i>Cas9 ZWF1 ACBP ACC1</i> <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntE1:: <i>CarRP-CarB-GGS1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20</i>	GBK19	IntC4-P _{TEFin} - <i>fusGGPPs7-</i>	pCasNA- IntC4

	IntF11::HpBKT IntE6::HpCrtZ IntC13::HpBKT IntC14::HpBKT IntB11::HpCrtZ IntE12::HpCrtZ IntC4::fusGGPPs7-CarRP		CarRP-T _{TEF} (SmiI)	
GBK21	MATa Δ pex10 Δ ku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20 IntF11::HpBKT IntE6::HpCrtZ IntC13::HpBKT IntC14::HpBKT IntB11::HpCrtZ IntE12::HpCrtZ IntC4::fusCarRP-GGPPs7	GBK19	IntC4-P _{TEFin} - fusCarRP- GGPPs7-T _{TEF} (SmiI)	pCasNA- IntC4
GBK22	MATa Δ pex10 Δ ku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20 IntF11::HpBKT IntE6::HpCrtZ IntC13::HpBKT IntC14::HpBKT IntB11::HpCrtZ IntE12::HpCrtZ IntC4::fusCarRP-GGPPs7 IntB1::CarB	GBK21	IntB1-P _{TEFin} - CarB-T _{TEF} (SmiI)	pCasNA- IntB1
GBK23	MATa Δ pex10 Δ ku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20 IntF11::HpBKT IntE6::HpCrtZ IntC13::HpBKT IntC14::HpBKT IntB11::HpCrtZ IntE12::HpCrtZ IntC4::fusCarRP-GGPPs7 IntB1::CarB IntD3::CarB	GBK22	IntD3-P _{TEFin} - CarB-T _{TEF} (SmiI)	pCasNA- IntD3
BKIIM Y-4871	MATa Δ pex10 Δ ku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20 IntF11::HpBKT IntE6::HpCrtZ IntC13::HpBKT IntC14::HpBKT IntB11::HpCrtZ IntE12::HpCrtZ IntC4::fusCarRP-GGPPs7 IntB1::CarB IntD3::CarB IntA4::fusCarRP-ERG20 ^{F88C}	GBK23	IntA4-P _{TEFin} - fusCarRP- ERG20 ^{F88C} -T _{TEF} (SmiI)	pCasNA- IntA4
BKIIM Y-4967	MATa Δ pex10 Δ ku70::URA3 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1	-	-	-
GF1	MATa Δ pex10 Δ ku70::URA3 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE8::P _{AraDH2} -GFP	BKIIM Y- 4967	pE8US1.1- P _{AraDH2} -GFP- T _{LIP2} (SmiI)	pCasNA- IntE8
BKIIM Y-5032	MATa Δ pex10 Δ ku70::URA3 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE8::P _{AraDH2} -CarRP- GGPPs7-P _{TEF} -CarB	BKIIM Y- 4967	pE8UA2.2- P _{AraDH2} -CarRP- GGPPs7- T _{ScADH1} -P _{TEF} - CarB-T _{LIP2} (SmiI)	pCasNA- IntE8
G0	MATa Δ ku70::URA3	(Yuzbasheva et al., 2019)	-	-
G1	MATa RAD52	BKIIM Y- 3178 (Taratynova et al., 2023)	pC13US1.1- P _{TEF} -RAD52- T _{LIP} (SmiI)	pCasNA- IntC13
G2	MATa ScSUC2 HXK1	(Taratynova et al., 2021)	-	-
G3	MATa Δ pex10 Δ ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20 ^{F88W-N119W}	GBK3	pAH-IntA2- P _{TEFin} - ERG20 ^{F88W- N119W} -T _{synt} (SmiI)	pCasNA- IntA2
G4	MATa Δ pex10 Δ ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20 ^{F88W-N119W} IntB1::ERG20 ^{F88W-N119W}	G3 (Taratynova et al., 2023)	pAH-IntB1- P _{TEFin} - ERG20 ^{F88W- N119W} -T _{synt} (SmiI)	pCasNA- IntB1
G5	MATa Δ pex10 Δ ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntF14::HMG1 IntD4::ERG12 IntA2::ERG20 ^{F88W-N119W} IntB1::ERG20 ^{F88W-N119W} IntE12::AaLIS	G4	pT-IntE12- P _{TEFin} -LIS-T _{XPR} (SmiI)	pCasNA- IntE12

G6	MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1$ <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntB1:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntE12:: <i>AaLIS</i> IntE16:: <i>AaLIS</i>	G5	pT-IntE16- P _{TEFin} - <i>LIS</i> -T _{XPR} (<i>SmiI/MssI</i>)	pCasNA- IntE16
G7	MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1$ <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntB1:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntE12:: <i>AaLIS</i> IntE16:: <i>AaLIS</i> IntC14:: <i>AaLIS</i>	G6	pT-IntC14- P _{TEFin} - <i>LIS</i> -T _{XPR} (<i>SmiI</i>)	pCasNA- IntC14
G8	MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1$ <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntB1:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntE12:: <i>AaLIS</i> IntE16:: <i>AaLIS</i> IntC14:: <i>AaLIS</i> IntC3:: <i>CrGPPS</i>	G7	pT-IntC3-P _{TEFin} - <i>CrGPPS</i> -T _{TEF} (<i>SmiI</i>)	pCasNA- IntC3
G9	MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1$ <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntB1:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntE12:: <i>AaLIS</i> IntE16:: <i>AaLIS</i> IntC14:: <i>AaLIS</i> IntC3:: <i>CrGPPS</i> $\Delta dgk1$	G8	Олиго димер Oligo106/Oligo 107	pCasNA- DGK1f, pCasNA- DGK1d
G10	MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1$ <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntB1:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntE12:: <i>AaLIS</i> IntE16:: <i>AaLIS</i> IntC14:: <i>AaLIS</i> IntC3:: <i>CrGPPS</i> $\Delta pah1$	G8	Олиго димер Oligo108/Oligo 109	pCasNA- PAH1a, pCasNA- PAH1b
G11	MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1$ <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntB1:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntE12:: <i>AaLIS</i> IntE16:: <i>AaLIS</i> IntC14:: <i>AaLIS</i> IntC3:: <i>CrGPPS</i> $\Delta dgk1$ IntC2:: <i>fusCrGPPS-LIS</i>	G10	pC2US1.1-P _{TEF} - <i>CrGPPS-LIS</i> - T _{LIP} (<i>MssI</i>)	pCasNA- IntC2
G12	MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1$ <i>DGA1 ScSUC2 HXK1</i> IntF14:: <i>HMG1</i> IntD4:: <i>ERG12</i> IntA2:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntB1:: <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> IntE12:: <i>AaLIS</i> IntE16:: <i>AaLIS</i> IntC14:: <i>AaLIS</i> IntC3:: <i>CrGPPS</i> $\Delta dgk1$ IntC2:: <i>fusAaLIS-CrGPPS</i>	G10	pC2US1.1-P _{TEF} - <i>LIS-CrGPPS</i> - T _{LIP} (<i>MssI</i>)	

* - *fus* в обозначении генотипа (например, *fusCarRP-GGPPs7*) обозначает трансляционный фьюжн между указанными генами (где ген *CarRP* слит через свой С-концевой участок с геном *GGPPs7* при помощи глицин-серинового мостика Gly-Gly-Gly-Ser).

Таблица 3. Плазмиды, используемые в этом исследовании.

Названия плазмид	Детали конструирования
Вспомогательные плазмиды для конструирования методом Golden Gate	
pAH-IntA1-bb	Сборка Гибсона:pARS-Cre-reverse (<i>SacI/PvuII</i>)* + Продукт ПЦР(Oligo001/Oligo002; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo033/Oligo034; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + pTEFin-uno (<i>NheI/BpiI</i>)** + Продукт ПЦР(Oligo035/Oligo036; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo037/Oligo038; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo039/Oligo040; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo003/Oligo004; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967)
pAH-IntA2-bb	Сборка Гибсона:pARS-Cre-reverse (<i>SacI/PvuII</i>)* + Продукт ПЦР(Oligo005/Oligo006; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo033/Oligo034; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + pTEFin-uno (<i>NheI/BpiI</i>)** + Продукт ПЦР(Oligo035/Oligo036; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo037/Oligo038; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo039/Oligo040; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo007/Oligo008; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967)

	+ Продукт ПЦР(Oligo037/Oligo038; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo039/Oligo040; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967) + Продукт ПЦР(Oligo031/Oligo032; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967)
pCasNA-RK	№175708 Addgene
pYTK001	№175709 Addgene
pC2US1.1	№175735 Addgene
pC13US1.1	№175654 Addgene
pE8US1.1	№175741 Addgene
pE8US1.2	№175742 Addgene
pE8UA2.2	№175700 Addgene
pGenC- <i>hrGFP</i>	№175722 Addgene
pProC-TEF1	№175721 Addgene
pTerC-LIP2	№175723 Addgene
pTerC-ScADH1	№175724 Addgene
pYTK001-P _{AraDH2}	Сборка Golden Gate - <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo041/Oligo042; матрица - геномная ДНК штамма ВКПМ Y-4967)
pYTK001- <i>CarB</i>	Сборка Golden Gate - <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo043/Oligo044; матрица - <i>CarB</i> фрагмент)
pYTK001- <i>CarRP-fus</i>	Сборка Golden Gate - <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo045/Oligo046; матрица - <i>CarRP-fus</i> фрагмент)
pYTK001- <i>fus-GGPPs7</i>	Сборка Golden Gate - <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo047/Oligo048; матрица - <i>fus-GGPPs7</i> фрагмент)
pE8US1.1-P _{AraDH2} - <i>CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1}</i>	Сборка Golden Gate - <i>Eco3I</i> : pE8US1.1 + pYTK001-P _{AraDH2} + pYTK001- <i>CarRP-fus</i> + pYTK001- <i>fus-GGPPs7</i> + pTerC-ScADH1
pE8US1.2-P _{TEF} - <i>CarB-T_{LIP2}</i>	Сборка Golden Gate - <i>Eco3I</i> : pE8US1.2 + pProC-TEF1 + pYTK001- <i>CarB</i> + pTerC-LIP2
pYTK001- <i>LIS-CrGPPS-I</i>	Сборка Golden Gate - <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo049/Oligo050; матрица - <i>AaLIS</i> фрагмент)
pYTK001- <i>CrGPPS-II</i>	Сборка Golden Gate - <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo051/Oligo052; матрица - <i>CrGPPS</i> фрагмент)
pYTK001- <i>CrGPPS-LIS</i>	Сборка Гибсона: pYTK001/ <i>LguI/Bsp1407I</i> + ПЦР продукт (Oligo053/Oligo054; матрица - <i>CrGPPS</i> фрагмент) + ПЦР продукт (Oligo055/Oligo056; матрица - <i>AaLIS</i> фрагмент)
Эписомальные Cas9-вспомогательные плазмиды	
pCasNa-DGK1d	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo057
pCasNa-DGK1f	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo058
pCasNA-IntA2	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo059
pCasNA-IntA4	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo060
pCasNA-IntB1	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo061
pCasNA-IntB11	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo062
pCasNA-IntC2	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo063
pCasNA-IntC3	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo064
pCasNA-IntC4	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo065
pCasNA-IntC13	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo066
pCasNA-IntC14	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo067
pCasNA-IntD3	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo068
pCasNA-IntD4	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo069
pCasNA-IntE6	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo070
pCasNA-IntE8	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом: pCasNA-RK и Oligo071
pCasNA-IntE12	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo072
pCasNA-IntE16	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo073
pCasNA-IntF11	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo074
pCasNA-IntF14	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo075
pCasNa-PAH1a	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo076
pCasNa-PAH1b	Рекомбинация плазмиды с олигонуклеотидом:pCasNA-RK и Oligo077
Экспрессионные плазмиды	
pAH-IntA1-P _{TEFfin} - <i>OsGGPPSI-T_{TEF}</i>	Сборка Гибсона: pAH-IntA1-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + фрагмент <i>OsGGPPSI</i>

pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>SaGGPPS</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntA1-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + фрагмент <i>SaGGPPS</i>
pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>GGPPs7</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntA1-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + фрагмент <i>GGPPs7</i>
pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>ERG20^{F88C}</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntA1-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + ПЦР продукт (Oligo078/Oligo079; pAH-IntA2-P _{TEFin} - <i>ERG20</i> -T _{synt}) + ПЦР продукт (Oligo080/Oligo081; pAH-IntA2-P _{TEFin} - <i>ERG20</i> -T _{synt})
pAH-IntA1-P _{TEFin} - <i>GGSI</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntA1-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + ПЦР продукт (Oligo082/Oligo083; W29 геномная ДНК)
pAH-IntF14-P _{TEFin} - <i>HMGI</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntF14-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo084/Oligo085; W29 геномная ДНК)
pAH-IntD4-P _{TEFin} - <i>ERG12</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntD4-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo086/Oligo087; W29 геномная ДНК)
pAH-IntA2-P _{TEFin} - <i>ERG20</i> -T _{synt}	Сборка Гибсона: pAH-IntA2-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo088/Oligo089; W29 геномная ДНК)
pE8US1.1-P _{AraDH2} - <i>GFP</i> -T _{LIP2}	Сборка Golden Gate - <i>Eco3I</i> : pE8US1.1 + pYTK001-P _{AraDH2} + pGenC- <i>hrGFP</i> + pTerC-LIP2
pE8UA2.2-P _{AraDH2} - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T _{ScADH1} -P _{TEF} - <i>CarB</i> -T _{LIP2}	Сборка Golden Gate - <i>Esp3I</i> : pE8UA2.2 + pE8US1.1-P _{AraDH2} - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T _{ScADH1} + pE8US1.2-P _{TEF} - <i>CarB</i> -T _{LIP2}
pAH-IntC4-P _{TEFin} - <i>fusCarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntC4-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo090/Oligo091; <i>CarRP</i> фрагмент) + Продукт ПЦР(Oligo092/Oligo093; <i>GGPPs7</i> фрагмент)
pAH-IntC4-P _{TEFin} - <i>fusGGPPs7</i> - <i>CarRP</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntC4-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo090/Oligo094; <i>GGPPs7</i> фрагмент) + Продукт ПЦР(Oligo095/Oligo093; <i>CarRP</i> фрагмент)
pAH-IntA4-P _{TEFin} - <i>fusCarRP</i> - <i>ERG20^{F88C}</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntA4-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo090/Oligo096; <i>CarRP</i> фрагмент) + Продукт ПЦР(Oligo097/Oligo079; pAH-IntA2-P _{TEFin} - <i>ERG20</i> -T _{synt}) + Продукт ПЦР(Oligo080/Oligo081; pAH-IntA2-P _{TEFin} - <i>ERG20</i> -T _{synt})
pAH-IntB1-P _{TEFin} - <i>CarB</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntB1-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo098/Oligo099; <i>CarB</i> фрагмент)
pAH-IntD3-P _{TEFin} - <i>CarB</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: pAH-IntD3-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo098/Oligo099; <i>CarB</i> фрагмент)
p-IntF11-P _{TEFin} - <i>HpBKT</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntF11-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>HpBKT</i> фрагмент
p-IntF11-P _{TEFin} - <i>BvcrtW</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntF11-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>BvcrtW</i> фрагмент
p-IntF11-P _{TEFin} - <i>AspcrtW</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntF11-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>AspcrtW</i> фрагмент
p-IntE6-P _{TEFin} - <i>AacrtZ</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntE6-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>AacrtZ</i> фрагмент
p-IntE6-P _{TEFin} - <i>HpCrtZ</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntE6-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>HpCrtZ</i> фрагмент
p-IntE6-P _{TEFin} - <i>fusHpBKT</i> - <i>HpCrtZ</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntE6-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo090/Oligo100; <i>HpBKT</i> фрагмент) + Продукт ПЦР(Oligo101/Oligo093; <i>HpCrtZ</i> фрагмент)
p-IntE6-P _{TEFin} - <i>fusHpCrtZ</i> - <i>HpBKT</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntE6-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo090/Oligo102; <i>HpCrtZ</i> фрагмент) + Продукт ПЦР(Oligo103/Oligo093; <i>HpBKT</i> фрагмент)
p-IntF11-P _{TEFin} - <i>fusHpCrtZ</i> - <i>HpBKT</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntF11-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo090/Oligo102; <i>HpCrtZ</i> фрагмент) + Продукт ПЦР(Oligo103/Oligo093; <i>HpBKT</i> фрагмент)
p-IntC13-P _{TEFin} - <i>HpBKT</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntC13-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>HpBKT</i> фрагмент
p-IntC14-P _{TEFin} - <i>HpBKT</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntC14-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>HpBKT</i> фрагмент
p-IntB11-P _{TEFin} - <i>HpCrtZ</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntB11-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>HpCrtZ</i> фрагмент
p-IntE12-P _{TEFin} - <i>HpCrtZ</i> -T _{TEF}	Сборка Гибсона: p-IntE12-bb (<i>SfaI/KspAI</i>) + <i>HpCrtZ</i> фрагмент
pC13US1.1-P _{TEF} - <i>RAD52</i> -T _{LIP}	Golden Gate Assembly - <i>Eco3I</i> : pC13US1.1 + pProC-TEF1 + pYTK001- <i>RAD52</i> + pTerC-LIP2
pAH-IntA2-P _{TEFin} - <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> -T _{synt}	Сборка Гибсона: pAH-IntA2-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo104/Oligo105; <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> фрагмент)
pAH-IntB1-P _{TEFin} - <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> -T _{synt}	Сборка Гибсона: pAH-IntB1-bb (<i>AarI/SdaI</i>) + Продукт ПЦР(Oligo104/Oligo105; <i>ERG20^{F88W-N119W}</i> фрагмент)
pT-IntE12-P _{TEFin} - <i>LIS</i> -T _{XPR}	Синтезирована в Twist Bioscience
pT-IntE16-P _{TEFin} - <i>LIS</i> -T _{XPR}	Синтезирована в Twist Bioscience
pT-IntC14-P _{TEFin} - <i>LIS</i> -T _{XPR}	Синтезирована в Twist Bioscience

pT-IntC3-P _{TEF_{in}} -CrGPPS-T _{TEF}	Синтезирована в Twist Bioscience
pC2US1.1-P _{TEF} -LIS-CrGPPS-T _{LIP}	Сборка Golden Gate - Eco3I: pC2US1.1 + pProC-TEF1 + pYTK001-LIS-CrGPPS-I + pYTK001-CrGPPS-II + pTerC-LIP2
pC2US1.1-P _{TEF} -CrGPPS-LIS-T _{LIP}	Сборка Golden Gate - Eco3I: pC2US1.1 + pProC-TEF1 + pYTK001-CrGPPS-LIS + pTerC-LIP2

* – плазмида описана в (Taratynova *et al.*, 2021)

** – плазмида описана в (Yuzbasheva *et al.*, 2020a)

Таблица 4. Праймеры, используемые в этом исследовании.

Номер	Название	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'
Oligo001	IntA1-Up-F	TTATGCATGCTACTTGGGTGTAATATTGGGATCCGAGCTCATTTAAATCAATGGTTTTTAAACAGGTC
Oligo002	IntA1-Up-R	ACTTCTGCAACCTCATGAGAAGCATTTTGATAGTTTAAACCCAGTACATTCATTTAATTATAAC
Oligo003	IntA1-Dn-F	GACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTAGGCCTAACCAACTCAATAGTACCATC
Oligo004	IntA1-Dn-R	CGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGATTTAAATAATATATACATTGAAAAACAAA C
Oligo005	IntA2-Up-F	TTATGCATGCTACTTGGGTGTAATATTGGGATCCGAGCTCATTTAAATTGGGGTCAAGATAGTCAC
Oligo006	IntA2-Up-R	ACTTCTGCAACCTCATGAGAAGCATTTTGATAGTTTAAACGTAATAAATATTCTATGAAGGTGG
Oligo007	IntA2-Dn-F	GACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTAGGCCTAACCTGGTAAAGCACACCC
Oligo008	IntA2-Dn-R	CGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGATTTAAATCAAAACACCTCATTTGG
Oligo009	IntA4-Up-F	ATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATCCGCATCAGGCATTTAAATCAGGACTTTGTTCCTCAAC
Oligo010	IntA4-Up-R	ACTTCTGCAACCTCATGAGAAGCATTTTGATAGTTTAAACAGGCTTTATCTAGACGAGAAA
Oligo011	IntA4-Dn-F	CACGTGACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTGTTTAAACAGGAGAAAAATATAAACGTTGGG
Oligo012	IntA4-Dn-R	TTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAAATAAACGGGTATTTTCTGCT
Oligo013	IntB1-Up-F	TTATGCATGCTACTTGGGTGTAATATTGGGATCCGAGCTCATTTAAATCAACTAAAAGGAGACCA
Oligo012	IntB1-Up-R	ACTTCTGCAACCTCATGAGAAGCATTTTGATAGTTTAAACTGCACATGAGTAGAAAAATAAAG
Oligo015	IntB1-Dn-F	GACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTAGGCCTCATGCTTAAACCTTGATTAGA
Oligo016	IntB1-Dn-R	CGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGATTTAAATATGCTCTTGTACTACAATCT
Oligo017	IntC4-Up-F	TTATGCATGCTACTTGGGTGTAATATTGGGATCCGAGCTCATTTAAATCTGCATATTCCAAACCG
Oligo018	IntC4-Up-R	ACTTCTGCAACCTCATGAGAAGCATTTTGATAGTTTAAACGTACAAGTACAAGTACAAGTGC
Oligo019	IntC4-Dn-F	GACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTAGGCCTTAGCAGCATCCACAGGCTTT
Oligo020	IntC4-Dn-R	CGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGATTTAAATCAATGAGCAAGTGTACACA
Oligo021	IntD3-Up-F	TTATGCATGCTACTTGGGTGTAATATTGGGATCCGAGCTCATTTAAATCCAAGTAAAGACTGGACA
Oligo022	IntD3-Up-R	ACTTCTGCAACCTCATGAGAAGCATTTTGATAGTTTAAACGTATACAACCATGGAGTGC
Oligo023	IntD3-Dn-F	GACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTAGGCCTAAAAGAAGCTGGACAAAGACC
Oligo024	IntD3-Dn-R	CGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGATTTAAATCAGGAGATTCCTGTCT
Oligo025	IntD4-Up-F	TTATGCATGCTACTTGGGTGTAATATTGGGATCCGAGCTCATTTAAATTTCCATGGCTGTCTGC
Oligo026	IntD4-Up-R	ACTTCTGCAACCTCATGAGAAGCATTTTGATAGTTTAAACTCCGCGCAAGACACATCTG
Oligo027	IntD4-Dn-F	GACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTAGGCCTACCTTTGCTTGTCTTCTGTCA
Oligo028	IntD4-Dn-R	CGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGATTTAAATCTCAGACGGCCCGGAT
Oligo029	IntF14-Up-F	TTATGCATGCTACTTGGGTGTAATATTGGGATCCGAGCTCATTTAAATAAGATAATCCAGCGGTGG
Oligo030	IntF14-Up-R	CAGATATTGTTGTAATAAGAAAATCTGGGTTGTAGGTGGCAGCGCTACTTCTGCAACCTCATGAGAAGCAT TTTGATAGTTTAAACCACAAGAACACGGCTGGG
Oligo031	IntF14-Dn-F	ACACCCCAAAAAGACCCGTCAGGACATCCTACTGCGTCACGTGACTATTAACATCAAAATCAGGTTG CAGAGGTTAGGCCTCTGCTTGTATGGTAGTACTTG
Oligo032	IntF14-Dn-R	CGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGATTTAAATAATGGTCTCCCCACCTTG
Oligo033	TXPR2-F	ACTATCAAAATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAAGTAGCGCTGCCACTACAAGCCAGATT
Oligo034	TXPR2-R	CTGTTTTTTGGGACACAATGCGCCGCCAACCCGGTCTCTGCGGCCGCTAGGCAATTAACAGATAGTTT
Oligo035	Cm-F	CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTCAGTACTAACCCGAGATATGCAGGTGGCTGATGTCCGGCGGTG
Oligo036	Cm-R	CACAAGCATATCTACAGCAAATGTATAGCAGGTGGCTAACCGTTTTTATCAGGCT
Oligo037	PEXP1-F	TTAGCCACCTGCTATACATTTGCTGTAGATATGTCTTGTGTG
Oligo038	PEXP1-R	GGTACAAGCAGCCCTGCAGGATAAGGATTTGGGCCCCG
Oligo039	TTEF-F	ACGGGCGCAAACCTCCTTATCCTGCAGGCTGCTTGTACCTAGTGCAA
Oligo040	TTEF-R	AGGCCTAACCTCTGCAACCTGATTTTGATGTTTAAATAGTCACGTGACTGAGTGACAGAGCCCTC
Oligo041	AraDH2-F	ATATCGTCTCATCGGGTCTCAACGGATCGATGTATTCCGATTGGCTCGATTGAC
Oligo042	AraDH2-R	TTAACGTCTCAGGTCGGTCTCATTGGATCCGATGATTTTGTGTGTGTGTGG
Oligo043	GGA-solo-F	ATATCGTCTCATCGGGTCTC
Oligo044	GGA-solo-R	TATACGTCTCTGGTCGGTCT
Oligo045	CarRP-F	ATATCGTCTCATCGGGTCTCAATGCTCCTGACCTACATGGA
Oligo046	CarRP-R	TTATACGTCTCTGGTCGGTCTCAGGCAATAGGGGCGGTTAGAGATT
Oligo047	GGPPS7-F	ATATCGTCTCATCGGGTCTCATGCCAGCTAGCACAAACCACTGTAGACAAGGAAAGATGCGGAACTCT AACACCATCGGAGGCGGATCCGTGGCTCAAACCTTTTAAACCTG
Oligo048	GGPPS7-R	TATACGTCTCTGGTCGGTCTCATAGATTAATGCTGTCCGGGGTG
Oligo049	Lis-I-GGA-F	ATATCGTCTCATCGGGTCTCAATGGCTCTTTCAACCGATTCTG
Oligo050	Lis-I-GGA-R	TATACGTCTCTGGTCGGTCTCAGGCACTTCTGCGACGACGGATCCGCCTCCGGAAGAGGAGTCTACAGCA
Oligo051	CrGPPS-II-F	ATATCGTCTCATCGGGTCTCATGCCAAATTAGCCAGCGCAG
Oligo052	CrGPPS-II-R	TATACGTCTCTGGTCGGTCTCATAGATTAATGCTGTCCGGGTGATGACTC
Oligo053	CrGPPS-Gib-F	CCCTGATCTGTGGATAACCGTAGTCGGGGTCTCAAATGGTCTGGCAGAAAGTCCCAA
Oligo054	CrGPPS-Gib-R	CAGAATCGGTTGAAAGAAGCGGATCCGCCTCCCTTTCTGTCGGGTGATGACTC

Oligo055	LIS-Gib-F	GAGTCATCACCCGACGAAAGGGAGGCGGATCCGCTTCTTCAACCGATTCTGCGTGT
Oligo056	LIS-Gib-R	GCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGGTCTGGTCCGCTCATAGATTAGGAAGAGGAGTCTACAG
Oligo057	DGK1d-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCACGAACGAGAACGAGAAATGGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo058	DGK1f-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAACCCATATGGCTGTACACCCAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo059	IntA2-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAACCATTCGAACCGCAAAGCCGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo060	IntA4-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAACTATGATGAACCTACGTTGGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo061	IntB1-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCACTTCGGCCAACTAAATCCTCGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo062	IntB11-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAAATGTTTGGAGAGACAACGACGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo063	IntC2-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCATCAAAAAGTCAGTGTGAGGGGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo064	IntC3-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAACTAACGCAGGATCAAGAGAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo065	IntC4-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAACTAACGCAGGATCAAGAGAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo066	IntC13-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAAGACATGATGCATATACACAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo067	IntC14-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCATCTCCATAGGTGTAGAACCAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo068	IntD3-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCACGAGTAGTGAGACCCATCTGGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo069	IntD4-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAAGTCGTGGTGGATCCTCAGGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo070	IntE6-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCATACGAGTAGAGACGTTAAACGGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo071	IntE8-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAAGGATAGTGCTTGTGTCCAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo072	IntE12-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAACCCCTATAGCCAACTGTGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo073	IntE16-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCATACTACTTGTAGTAGGACAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo074	IntF11-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAAGTGGTATGGCTCTTCACACGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo075	IntF14-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAACTGGCAGACAGATAAGACAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo076	PAH1a-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCAAGTATCGCTGTTGGAAAACGGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo077	PAH1b-20bp	TCGATGGGCCCCCGGTTTCGATTCCGGGTCCGGCGCATTTCTGGGACGGTCCGACGAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAAAAGGC
Oligo078	ERG20(F88C)-F	CACGTCATCCGACCCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCCGAGTCCAAGGCGAAATTCGAAAGC
Oligo079	ERG20F88C-1-R	ATAATGTCGTCCGACACGAGGCAAAACGCTGCAGCAGCTCA
Oligo080	ERG20F88C-2-F	AGCTGCTGCAGGCGTTTTGCCCTCGTGTCCGACGACATT
Oligo081	ERG20-toTEF-R	TAATTTTTAACAACTGGGGTTGCACTAGGTACAAGCAGCCTACTTCTGTGCTTGTAATC
Oligo082	GGSI-F	CACGTCATCCGACCCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCCGAGTGGATTATAACAGCGCGGATT
Oligo083	GGSI-R	TAATTTTTAACAACTGGGGTTGCACTAGGTACAAGCAGCTCACTGCGCATCCTCAAAGT
Oligo084	HMG1-F	CACGTCATCCGACCCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCCGAGTACAAGCAGCTATTGGAAAGA
Oligo085	HMG1-R	TAATTTTTAACAACTGGGGTTGCACTAGGTACAAGCAGCCTATGACCGTATACAAATATTCG
Oligo086	ERG12-F	CACGTCATCCGACCCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCCGAGGACTACATCATTTCCGGCGCCA
Oligo087	ERG12-R	TAATTTTTAACAACTGGGGTTGCACTAGGTACAAGCAGCCTAATGGGTCCAGGACCGAT
Oligo088	ERG20-F	CACGTCATCCGACCCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCCGAGTCCAAGGCGAAATTCGAAAGCGT
Oligo089	ERG20-R	TAATTTTTAACAACTGGGGTTGCACTAGGTACAAGCAGCTTTGAAAGATGATACTCTTTATTCCTACATA AGTAAATGAGTTTTATATAGCTACTTCTGTGCTTGTAAATC
Oligo090	P _{TEF} _{in} -overhang-F	CACGTCATCCGACCCAGCACT
Oligo091	CarRP-N- toGGPs7-R	AAAGTTTGAGCCACGGATCCGCCTCCGATGGTGTGAGGTTTCTCAT
Oligo092	GGPs7(C)- toCarRP-F	ACCTCAACACCATCGGAGGCGGATCCGTGGCTCAAACCTTTTAACTGGA
Oligo093	T _{TEF} -overhang-R	TAATTTTTAACAACTGGGGTTG
Oligo094	GGPs7(N)- toCarRP-R	ATGTAAGTCAGCAGGATCCGCCTCCATGCTGTCCGGGTTGAT
Oligo095	CarRP(C)- toGGPs7-F	CCGGCGCAGCAGCATGGAGGCGGATCCCTGCTGACTTACATGGAGGT
Oligo096	CarRP(N)- toERG20-R	AATTTCCGCTTGAGGATCCGCCTCCGATGGTGTGAGGTTTCTCAT
Oligo097	ERG20(C)- toCarRP-F	ACCTCAACACCATCGGAGGCGGATCCCTCAAGGCGAAATTCGAAAGC
Oligo098	CarB-F	CACGTCATCCGACCCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCCGAGTCCAAGAAGCAGTCTGATC
Oligo099	CarB-R	TAATTTTTAACAACTGGGGTTGCACTAGGTACAAGCAGCTTAATAACGTTAGAGTTGTGCAC
Oligo100	HpBKT(Nfus)-R	TGCAGTTGGAGAGGATCCGCCTCCGGCGAGAGCGGGGACAGT

Oligo101	<i>HpCrtZ(Cfus)-F</i>	TCCCCGCTCTCGCCGGAGGCGGATCCCTCTCCAAGCTGCAGTCTATCTCTGT
Oligo102	<i>HpCrtZ(Nfus)-R</i>	GCAGAGGCGACGTGAGATCCGCCCTCTCGCTTAGACCAGTCCAGC
Oligo103	<i>HpBKT(Cfus)-F</i>	ACTGGTCTAAGCGAGGAGGCGGATCTCACGTCGCTCTGCCTGATGGTCGAGCAGAA
Oligo104	<i>ERG20m-F</i>	CACGTCAATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCCGACGTCCAGGCGAAATTCGAAAGC
Oligo105	<i>ERG20m-R</i>	TAATTTTTAACAACTGGGGTTGCACTAGGTACAAGCAGCCTACTTCTGTCTGTTGTAAATC
Oligo106	Δ DGK1-F	AAACCAATTCTAACACCACCGACACCAACGGCGAAGACCTGTTGGCGTTCTGGCATAATGTCTGAGATCGC ATGTCTCTTTCTATACGGCATCATCATCCCCAAGTACGGCGCTGAAGTC
Oligo107	Δ DGK1-R	GACTTCAGCGCCGTACTTGGGGATGATGATGCCGTATAGAAAGAGACATGCGATCTCAGACATTATGCCAG AACGCCAACAGGTCTTCGCCGTTGGTGTGGTGGTGTGTTAGAATTGGTTT
Oligo108	Δ PAH1-F	TATGTCATATGGACAAAGTTGTAAGAGGCCAATACAACCTGGAGCAACCAGCTTGTTCGATATTATTCTGG ATATGACTGGTTACAAGTACGACCACGAGGACGTGAGTCGATCAGAGGA
Oligo109	Δ PAH1-R	TCCTCTGATCGACTCAGTCTCGTGGTGGTCTACTTGTACCAGTCATATCCAGAATAATATCGAAACAAGC TGGTTGCTCCAGTTGATATGGCCCTTTACAACCTTGTCCATATGACATA
Oligo110	DGK1-KO-F	ATGTCTGTGCATCTACTGG
Oligo111	DGK1-KO-R	ACTCATTCACTCTGGTTAGTC
Oligo112	IntA2-chr-F	GCCATAATAGACTAGCAAG
Oligo113	IntA2-chr-R	GCCAATTATCTCTTATTCAATTC
Oligo114	IntA4-chr-F	ATCAGTCGGCTGTGGACTTG
Oligo115	IntA4-chr-R	ATCACAGATTCGCAGATTCAC
Oligo116	IntB1-chr-F	ACCACCTGTCTTATCCAAC
Oligo117	IntB1-chr-R	GGCATAACCATGGGTTTCAAG
Oligo118	IntB11-chr-F	ATCGGTTGCAAAACGCTGAC
Oligo119	IntB11-chr-R	TGACCCTTCGTTACGGACC
Oligo120	IntC2-chr-F	GTGTGTCCAACCAAGTGAG
Oligo121	IntC2-chr-R	AGAACCCTCGTTGAGGTC
Oligo122	IntC3-chr-F	AGTCTACTGATTCGGAAGGC
Oligo123	IntC3-chr-R	ACGCTGCTCCTCGTGCAAC
Oligo124	IntC4-chr-F	AGTCTACTGATTCGGAAGGC
Oligo125	IntC4-chr-R	ACGCTGCTCCTCGTGCAAC
Oligo126	IntC13-chr-F	CCATGTGTCTATAAGTACAGC
Oligo127	IntC13-chr-R	TAACCCTGACAGTTTGATAGC
Oligo128	IntC14-chr-F	AACCTTCTGAAACTTGCTTTCC
Oligo129	IntC14-chr-R	AACCAAAACAGTATCAAAGG
Oligo130	IntD3-chr-F	TAGATGAAGTTGGGGATATCTC
Oligo131	IntD3-chr-R	ACAGGCGATGAGCGACGTG
Oligo132	IntD4-chr-F	AGCAGGGCTACAGAAGAAAC
Oligo133	IntD4-chr-R	TATGTCACCCGACCTGTCC
Oligo134	IntE6-chr-F	ACTCAACTGTGAATACTTCGG
Oligo135	IntE6-chr-R	TCCTGGTTAAAGGGGGTTTC
Oligo136	IntE8-chr-F	TAATCATACTGCGCCGTGCC
Oligo137	IntE8-chr-R	GGCTCTTAAAGCGTTCAGA
Oligo138	IntE12-chr-F	TTGAATGATGGACTCATAGATG
Oligo139	IntE12-chr-R	AAGAGGTACGTGATGCGG
Oligo140	IntE16-chr-F	TCGTGCATTTCGAAACACAAG
Oligo141	IntE16-chr-R	ATGTAACACGTTCCAGACCAGT
Oligo142	IntF11-chr-F	ACCTGACTGTTTACATCCGC
Oligo143	IntF11-chr-R	TCAAGTTCTTGCACTCTGTTC
Oligo144	IntF14-chr-F	AAGTCGCAAAACAAGAGAATTAC
Oligo145	IntF14-chr-R	CTATTTGACAAGAATAGCATATCC
Oligo146	PAH1-KO-F	CTCTGTGAAGGTGCCAAC
Oligo147	PAH1-KO-R	ACGTCAAACGGATGGTCTTG
Oligo148	OligUp-R	ACTATCGGTAGAGCCAATTAG
Oligo149	OligDn-F	GAAGTTGGTGAAAACATTTACG

Таблица 5. Фрагменты ДНК, используемые в этом исследовании. Жирным шрифтом выделена кодируемая часть соответствующего фрагмента, либо гомологичный к локусу интеграции участок ДНК.

<i>ScRAD52</i>	
ATATCGTCTCATCGGGGTCTCAA ATGGCCTTTCTCTCGTACTTCGCCACCGAGAATCAGCAGATGCAGACACGAAGGCTG CCGCGCACTGCCGAAGGTTCTGGCGGTTTCGGCGTTCTTCTGATGAACGAGATCATGGACATGGATGAGAAGAAGCCTGT CTTTGGCAACCACTCAGAGGACATCCAGACCAAACCTGGACAAGAAGCTTGGACCTGAGTACATTTCCAAGCGAGTCGGCT TCGGTACATCGCGAATCGCCTACATTGAGGGATGGAGAGTGATCAACCTCGCTAACCCAGATCTTCGGATACAACGGCTGG TCTACGGAGGTCAAGAGCGTAGTCATCGACTTCTTGGATGAGCGACAGGGAAAGTTTCAGTATTGGCTGCACCGCCATTGT CCGTGTTACTCTTACCTCCGGCACCTATAGAGAAGATATTGGATATGGAACGGTGGAGAATGAACGACGTAAACCCCGAC	

CGTTTGAGCGAGCCAAAAAGTCTGCTGTTACAGACGCCCTCAAGCGGAGTCTGAGAGGTTTTGGAAAACGCTCTCGGAAAAC
 TGTCTGTATGACAAAGATTTTTCTGGCAAAGATTGACAAGGTCAAGTTCGACCCTCCCGATTTTTGACGAAAAAATCTCTT
 CCGACCTACCGACGAGATTTCCGAGTCTAGCAGGACCAACACCCTTCATGAAAACCAGGAACAACAACAGTACCCCAACA
 AGCGACGACAGCTAACAAAAGTACGAACACTAACCCCGACTCTACCAAGAACCTGGTGAAAATCGAAAATACCGTTTCT
 CGAGGTACCCCATGATGGCTGCCCTGCTGAGGCTAACTCCAAAAACTCGTCCAACAAGGACACCGATCTCAAGTCACT
 CGACGCGTGAAGCAGGATCAAGATGACTTGTGGATGATAGCCTCATGTTCTCCGACGATTTCCAGGACGACGACCTGA
 TTAACATGGGGAATACAAACTCAAACGTGCTAACCACTGAGAAGGACCCCGTTGTGGCCAAGCAGTCCCCCACCGCCCTCT
 TCTAATCCTGAGGCCGAACAGATAACCTTTGTGACTGCCAAGGCTGCAACTTCTGTGCAGAACGAGCGGTACATCGGCGA
 GGAGAGCATTTCGACCCCAAGTACCAGGCCAGAGCATCCGACACACGGTTGACCAGACTACATCGAAGCACATCCCCG
 CTTCCGGTCTTAAAAGATAAGACCATGACCACTGCGCGAGACTCTGTCTACGAGAAGTTTTGCCCCCAAGGGCAAACAATTG
 TCCATGAAGAACAACGACAAGGAGCTGGGACCACACATGCTGGAGGGTGTGGTAACCAGGTGCCTCGAGAGACTACCC
 CATCAAGACGAACGCCACGGCCTTCCCGCCTGCCGCTGCTCCTCGGTTTTGCACCTCCAAGTAAAGTGGTGCATCCTAATG
 GCAACGGAGCCGTCCCGGCAGTACCCAGCAACGATCTACTCGGCGCAAGTGGGTGCTCCAAAGATTAACCCGCTGCAT
 GCTCGAAAGCCACTTAACTATGAGACCGACCAGAGA

OsGGPPI

CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCAGACTGGATTTGACTTCAACGCCTACATGGGCGAAAAGGCCG
 CAGCTGTCAACCGAGCCCTGGACGCTTCCATCCCGGCAGACGAGCCTCCTGCTGCCTTGACGAGGCTATGCGATACGCT
 CTCTTGGCCGGCGGCAAGCGAGTTCGTCCCGCCTGTGTCTGGCGCCCTGTGCTGTTGTGCGGAGGCAGAGAAGCCTGGG
 CATGCTGCCGACGAGTGTGAGATGTTGATACCATGAGCCTCGTCCATGACGATCTGCCCTGCATGGACGACGATG
 ATCTTAGACGAGGAAAGCCACCTGTCTGTTGGTCTACGGAGAACCCTCGCCGACTGACCGGTGACGCCCTTTAAGC
 CTTAGTTTTCCACCACATGGCCGTTTTGATTGCTATCCTCCGATATCGACGCTGATAAGCACCCCGCAGGAGTGGTTAG
 AGCCATTGGTGAGCTTGCTCGATGCATCGGTTCCGAGGGCCTGGTGGCCGGCCAGGTGGTGGATCTCGAAAATGACTGGTT
 CAACAGAAACAGTTTCTCTGGAGAGGTTGGAGTACATCCACCTTACAAGACTGCCGCTCTCCTCGAGGCGTCTGTGCTC
 ATTGGAGCCATCCTCGGGGGTGGATCTGACGAACAGATAGAGTCTCTGCGAATGTACGCCCGGTCCATTGGCCTGCTATT
 CCAGGTTGTGGACGACATTCTGGACGTGACCAAGTCTTCTGAGGAGCTGGGCAAAACGGCTGGCAAGGACCTGGCTTCAG
 ACAAGACCACCTACCCCAAACCTGCTAGGACTTGAAAATCTCGAGAGTTTTGCTGAGAAGCTTCTCTCGGATGCCCGGAG
 CAGCTGTCCGGTTGACACGAGGACTGCTGCGCCACTTTGCATCTGGCCAACTACATTGCCTATCGGCAAAATTGAGC
 TGCTTGTACCTAGTGCAACCCAGTTTTGTTAAAAATTA

SaGGPPS

CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCAGACTTACTTTGACAACACTTCAACGAGATTGTGAATTGCG
 TCAATGACATTATCAAGTCGTACATTTCCGGCGATGTGCCAAAGCTTTACGAGGCCAGTTATCATCTGTTTACGCTCTGGT
 GGCAAGCGACTGCGGCCTTTGATTCTGACTATTTTATCAGATCTCTTCCGAGGCCAGCGAGAGCGGGCCTACTACGCCGG
 AGCTGCCATTGAAGTTTTGCACACCTTCACTCTGGTACACGACGATATCATGGACCAGGACAACATACGACGTGGACTGC
 CTACAGTCCATGTCAAGTACGGCCTACCACCTTGCAGTACTTGCAGGAGATCTCTTACACGCCAAGGCATTTACAGCTGCTG
 ACACAGGCCCTGCGAGGTCTGCCGAGTGAAACCATCATCAAGGCTTTGACATCTTTACCCGATCCATCATATTATCTC
 AGAGGGTCAAGCTGTGGACATGGAGTTTGGAGATCGCATTGACATCAAGGAGCAGGAGTACCTGGATATGATCTCTCGAA
 AGACTGCTGCTCTGTTCTCCGCATCTTCTTATTGGCGCCCTGATTGCTGGTCCAACGATAATGACGTGCGATTAATG
 TCCGACTTTGGGACCAACTTGGGAATTGCTTTCCAGATCGTTGACGACATTCTCGGCCTCACCGCCGACGAAAAGGAACT
 GGGCAAACCCGTGTTACGCGATATTAGAGAAGGCAAGAAAACCATTCTGGTCAAAAACCTCTCGAGCTGTGCAAGGAGG
 ACGAGAAGAAGATCGTTCTAAAGGCTCTCGGAAACAAGTCTGCGTCCAAGGAAGAGCTCATGTGAGCGCCGACATTATT
 AAAAAATATTCTCTGGACTACGCTTACAACCTCGCTGAGAAGTACTACAAGAACGCCATCGATTCTTTAACAGGTGAG
 CTCGAAGTCCGATATCCCGGAAAGGCCCTCAAATATCTTCCGAGTTCACGATCAGACGTAGAAAATGAGCTGCTTGTA
 CCTAGTGCAACCCAGTTTTGTTAAAAATTA

GGPPs7

CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCAGACTGGCTCAAACCTTTCAACCTGGATACTACCTATCTCAGC
 GACAGCAGCAAGTCGAGGAGGCATTGTGCTGCTCTTGTTCGGCGTATCCTGAGCGAATCTACGAGGCTATGCGATAC
 TCTTTGCTCGCTGGCGGCAACGTCTGCGACCCTCCTCTGTCTGGCAGCCTGCGAGCTTGTGGAGGGAGTGTGGAACA
 GGCCATGCCACTGCTTGTGCTCTTGGAGATGATCCACCATGTCTCTGATTACACGACGATCTTCCCGCCATGGACAATG
 ATGACTTCAGAAGAGGTAACCAACCAACCAAGGTGTTTGGCGAGGACATCGCCATCTTGGCAGGAGACGCCCTCTTA
 GCCTATGCCTTTGAGCACATTGCCTCGCAGACGCGCGGAGTCCCTCCCCAGCTGGTGTGCTGACGTTATTGCTCGAATTGG
 TCATGCTGTTGCCGCCACCGGTCTTGTGCGAGGCCAGGTGGTAGATCTGGAATCGGAAGGCAAGGCCATCTCCCTAGAGA
 CTCTGGAGTACATTCAATCCATAAGACGGGGGCGTTGTTGGAGGCGTCCGTGCTGTCTGGAGGTATTCTCGCAGGAGCC
 GACGAGGAGCTCCTCGCTCGGCTCAGCCACTACGCCCGAGATATAGGTCTGGCCTTCCAGATTGTGACGACATTCTGGA
 CGTGACAGCCACTTCTGAGCAACTCGGAAAGACCGCAGGCAAGGACCAGGCTGCAGCGAAGGCCACATACCCGTGCTGC
 TGGGCCTGGAAGCCTCACGTGAGAAGGCGGAAGAGCTCATCCAGTCCGCCAAGGAGGCTCTGAGACCCTACGGCAGCCAA
 GCCGAACCTCTGCTGCGCCTGGCTGATTTTATCACCCGGCGACAGCATTGAGCTGCTTGTACCTAGTGCAACCCAGTTT
 GTTAAAAATTA

ERG20^{F88C}

TCCAAGGCGAAATTCGAAAGCGTGTTCCTCCGAATCTCCGAGGAGCTGGTGCAGCTGCTGCGAGACGAGGGTCTGCCCA
 GGATGCCGTGCAGTGGTTTTCCGACTCACTTCAGTACAACCTGTGTGGGTGGAAAGCTCAACCGAGGCCTGTCTGTGGTGC
 ACACCTACCAGCTACTGACCGCAAGAAGGAGCTCGATGACGAGGAGTACTACCGACTCGCGCTGCTCGGCTGGCTGATT
 GAGCTGCTGCAGGCGTTTTTCTCGTGTGCGACGACATTATGGATGAGTCCAAGACCCGACGAGGCCAGCCCTGCTGGTA

CCTCAAGCCCAAGGTCGGCATGATTGCCATCAACGATGCCTGCATGCTAGAGAGTGGCATCTACATTCTGCTTAAGAAGC
 ATTTCCGACAGGAGAAGTACTACATTGACCTTGTGCGAGCTGTTCCACGACATTTTCGTTCAAGACCGAGCTGGGCCAGCTG
 GTGGATCTTCTGACTGCCCCGAGGATGAGGTTGATCTCAACCGGTTCTCTCTGGACAAGCACTCCTTTATTGTGCGATA
 CAAGACTGCTTACTACTCCTTCTACCTGCCCGTTGTTCTAGCCATGTACGTGGCCGGCATTACCAACCCCAAGGACCTGC
 AGCAGGCCATGGATGTGCTGATCCCTCTCGGAGAGTACTTCCAGGTCCAGGACGACTACCTTGACAACCTTTGGAGACCC
 GAGTTCATTGGTAAGATCGGCACCGACATCCAGGACAACAAGTGTCTCCTGGCTCGTTAACAAGCCCTTCAGAAGGCCAC
 CCCCAGCAGCGACAGATCCTCGAGGACAACCTACGGCGTCAAGGACAAGTCCAAGGAGCTCGTCATCAAGAACTGTATG
 ATGACATGAAGATTGAGCAGGACTACCTTGACTACGAGGAGGAGGTTGTTGGCGACATCAAGAAGAAGATCGAGCAGGTT
 GACGAGAGCCGAGGCTTCAAGAAGGAGGTGCTCAACGCTTTCCTCGCCAAGATTTACAAACGACAGAAAGTAG

CarB

ATATCGTCTCATCGGGGTCTCAAATGTCCAAAAGCACATTGTGATCATTGGCGCAGGAGTTGGAGGTAAGTCCACCGCG
 GCAAGACTGGCTCGAGAGGGGTTAAGGTCACGTTGTTGAGAAGAACGACTTTGGAGGAGGCCGATGCAGCCTTATCCA
 CCACCAGGGTTCATCGATTGATCAAGGCCCCAGCCTGTACCTCATGCCTAAGTACTTTGAGGACGCATTTGCTGATCTCG
 ACGAGCGTATTCCAGGACCATCTGGAGTTGCTCAGATGTGACAACAACCTACAAGGTGCACTTTGACGACGGCGAGTTCGATC
 CAGCTCTCTAGCGACCTAACCCGAATGAAGGCAGAAGTGGATCGAGTGGAGGGTCTCTGGGGTTCGGCCGGTTCTTGGA
 TTTTCATGAAGGAGACTCACATCCACTACGAGTCTGGTACGCTGATCGCTCTCAAAAAAACTTTGAATCAATTTGGGACC
 TGATTCGAATCAAGTATGCCCCGAAATCTTCCGGCTTCATCTTTTTGGAAAGATTTACGACCGCGCCTCTAAGTACTTC
 AAGACCAAGAAAATGCGCATGGCTTTTACCTTCCAGACCATGTACATGGGCATGTACCTTATGACGCTCCCGCGTCTA
 CTCGTTGCTGCAGTACACCGAGTTTGGCGAGGGAATCTGGTACCCACGAGGCGGCTTCAACATGGTGGTTCAAAGCTTG
 AAGCCATTGCCAAGCAGAAATATGATGCTGAGTTCATCTACAACGACCCCGTGGCCAAAATCAACACCGACGATGCCACA
 AAACAGGTGACCGGTGTACCTTAGAAAATGGTTCATATAATCGATGCAGATGCTGTGCTATGCAACGCCGATCTCGTGTA
 TGCTTACCACAACCTGTTACCTCCTTGTGATGGACCCAGAACACGTTGGCCTCCAAGAAGCTGACTTCTTCCAGCATCT
 CTTTCTACTGGTCCATGTGCGACTAAGGTTCTCAACTTGACGTGCATAACATCTTTCTTGGCGAGGCCCTACCAGGAGAGT
 TTCGACGAAATTTTCAAGGACTTCGGCTTGCCTCCGAGGCTTCGTTCTATGTGAATGTGCCCTCGAGGATTGACCCCTC
 TGCTGCACCAGACGGCAAGGATTCTGTGATTGTACTCGTCCCATTGGACACATGAAGTCCAAGACAGGCGACGCCTCCA
 CTGAAAATACCCCGCCATGGTCGACAAGGCCCGAAAGATGGTTCTCGCCGTCATTGAACGTAGACTGGGTATGTCTAAC
 TTCGCCGACCTCATTGAGCACGAGCAGGTCAACGATCCTGCTGTGTGGCAGAGTAAGTTC AACCTCTGGAGAGGATCGAT
 TCTGGGACTCTCGCACGACGCTCTGCAAGTGTGTGGTTTTCGTCTTCAACCAAGGACTCGACAGGTCGATACGATAATC
 TCTTCTTTGTGGTGCCTCAACGCATCCCGGAACTGGTGTACCAATAGTTCTTGGCGGCTCCAACCTTACATCCGACCAG
 GTGGTCAAGTCTTTTTGGTAAGACTCCGAAGCCCCGGAAGATCGAGATGGAGAACACACAGGCCCGCTGGAGGAGCCTGA
 TGCGGAGTCCACTTTTCCCGTTTTGGTTCTGGCTGCGGGCTGCCTTCTGGGTTCATGTTTATGTTCTTCTACTTTTTCCCCC
 AGTCTAACGGCCAGACTCCTGCGTCTTTCATTAACAATCTGCTACCGGAGGTGTTCCGAGTCCACAACCTCCAATGTTATC
 TAACTATGAGACCGACCAGAGACGTATA

CarRP-fus

ATATCGTCTCATCGGGGTCTCAAATGTCTCCTGACCTACATGGAGGTGCATCTGTAAGTACTACTTTGCCTGTTCTGGGAGTC
 CTGTTTGGCTGTCTCGACCCTACTACACGGCCACAGACGCCCTCAAATTCAGTTTTCTGACTCTAGTTGCATTCACCAC
 TGCTTCCGCTTGGGACAACCTACATTGTCTACCACAAGGCCTGGTCATACTGCCCTACCTGTGTGACTGCTGTCTATTGGTT
 ACGTGCCGTTGGAAGAGTACATGTTTTTATTATCATGACTCTGCTAACCGTGGCCTTTACTAATCTAGTGATGAGATGG
 CACCTCCACTCTTTCTTTATCCGACCAGAGACTCCCGTCATGCAGTCCGTCCTTGTGCGACTTGTCCCACATCACAGCACT
 TCTCATCACCGCCTACAAGGCGTGGCATCTCGCAGTTCCTGGAAAACCGCTGTTCTATGGAAGTTGTATCTTGTGGTACG
 CATGCCCGTGCTGGCCCTGCTGTGGTTCCGAGCCGAGTACATGATCGCAGCACCATTGGCTGTCTTGTCTCGATT
 GCGTCCCGAGTTTCTTCTCTGCTGGGTGATGTCTGGCTTATGGCGCTGGAACATGGGACATCAGCCTGGCCATC
 TACAGGTAAGTTTTGCTGCTCATTACCCGTTGAGGAGTTCATGTTCTTTGCTCTGATCAACACTGTCTTGGTGTGTTG
 GTACCTGTGCTATTGATCGCACCATGGCAATCTACATCTTTTTCAAGAACAATCTCCTTACCAACGTCCTTACCAGCAT
 TCGAAATCATTCTGCACCAGATTCTTGAATGACCTGGGCCTTCTGTTTGGCAGACCAAGTCTCCACAGCGACACCTT
 CCACGACCTGTCCGTGTCTGGGACATCCTGCGCAAGGCTTCAAAGAGTTTTTACACGGCATCTGCTGTGTTCCCGGTG
 ACGTGCAGACAGGAGCTCGGCGTGTCTATGCCTTTTGTGAGCCACCGACGACCTGTGTGATAACGAGCAGGTCCCGGTC
 CAGACTCGAAAGGAACAGCTGATTCTGACACATCAGTTCGTGTCTGATCTGTTTGGACAAAAGACTTCCGCTCCACTGC
 GATTGACTGGGATTTCTACAACGACCAGCTCCCGCCAGTTGCATTTCTGCGTTTTAAATCCTTTACTCGTCTGAGGCATG
 TTCTCGAGGCCGGTGCCATAAAGGAGCTGCTCGATGGCTACAAGTGGGATCTCGAACGAAGATCGATCCGGGATCAGGAG
 GATCTTCCGTAATTTCTGCTGTGTTGCGTCTGCTCCGTTGGTGAGATGTGCACGCGGATAATCCTGGCTCACGCCGATAA
 GCCCGCTCCAGACAGCAGACCAGTGGATCATCAACGGGCCGAGAGATGGGCCTGGTACTCCAGTACACCAACATTTG
 CACGTGACATTGTACGGACTCGGAGGAACCTCGGACGTTGCTACCTGCCCCAGGACTGGCTCACTGAGAAGGAAGTTGCT
 TTGATCCAGGGCGGGTTGGCTCGAGAAATGGAGAGGAGAGATTGCTTTTCGCTCAGCCACAGACTCATCTACCAGGCTGA
 CGAGCTAATGGTTGTTGCCAACAAGGTATCGACAAGCTGCCCTCCACTGCCAGGGCGGCTACGCGCTGCTGCAACG
 TGTATGCCTCCATCGGAACCAAGCTCAAGTCTTATAAGCACCCTACCCGTCGCGAGCGCACGTGGGGAACAGCAAGCGA
 GTGGAGATTGCTCTGCTTCCGTGTATAATCTCTACACCGCCCTATTGCCAGTCTAGCACAACCCACTGTAGACAAGG
 AAAGATGCGGAATCTCAACACCATCTAACTATGAGACCGACCAGAGACGTATA

fus-GGPPs7

ATATCGTCTCATCGGGGTCTCAAATGGTGGCTCAAATTTTAACTGGATACCTACCTATCTCAGCGACAGCAGCAAGTC
 GAGGAGGCATTGTGACTGCTCTTGTTCGGCGTATCCTGAGCGAATCTACGAGGCTATGCGATACTTTTGTCTGCTGG
 CGGCAACGCTTGCAGCCATCCTCTGTCTGGCAGCCTGCGAGCTTGTGGAGGGAGTGTGGAACAGGCCATGCCACTG

CTTGTGCTCTTGAGATGATCCACACCATGTCTCTGATTACAGCAGATCTTCCC GCCATGGACAATGATGACTTCAGAAGA
GGTAAACCAACCAACCACAAGGTGTTTGGCGAGGACATCGCCATCTTGGCAGGCGACGCCCTTTAGCCTATGCCTTTGA
GCACATTGCCTCGCAGACGCGGGAGTCCCTCCCAGCTGGTGTGTCAGGTTATTGCTCGAATTGGTCATGCTGTTGCCG
CCACCGGTCTTGTGCGAGGCCAGGTGGTAGATCTGGAATCGGAAGGCAAGGCCATCTCCCTAGAGACTCTGGAGTACATT
CATTCCCATAAGACGGGGCGTGTGGAGGCGTCCGTGCTGTCTGGAGGTATTCTCGCAGGAGCCGACGAGGAGCTCCT
CGCTCGGCTCAGCCACTACGCCGAGATATAGGTCTGGCCTTCCAGATTGTGACGACATTCTGGACGTGACAGCCACTT
CTGAGCAACTCGGAAAGACCGCAGGCAAGGACCAGGCTGCAGCGAAGGCCACATACCCGTCGCTGCTGGGCCTGGAAGCC
TCACGTCAGAAGGCGGAGGAACCTCATCCAGTCCGCCAAGGAGGCTCTGCGACCCTACGGCAGCCAAGCCGAACCTCTGCT
CGCCCTGGCTGATTTTCATCACCCGGCGACAGCATTAACTATGAGACCGACCAGAGACGTATA

HpBKT

CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACC GCAGCACGTGGCCTCTGCTCTGATGGTCGAGCAGAAGGGCTCTG
AGGCCGCTGCCTCTTCTCCCGACGTGCTGCGAGCCTGGGCTACCCAGTACCACATGCCTTCCGAGTCTCTGACGCCGCT
CGACCCGCTCTGAAGCAGCCTACAAGCCTCCAGCCTCCGACGCCAAGGGCATCACCATGGCTCTGACCATCATCGGAAC
CTGGACCGCCGTGTTCTGCACGCCATCTTCCAGATTCGACTGCCACCTCTATGGACCAGCTGCACTGGCTGCCCGTGT
CTGAGGCCACCGCTCAGCTGCTCGGCGGATCTTCTTCTGCTGCACATTGCCCGCTTTTATCGTGTCTGAGTTCTCTG
TACACCGGCTGTTTCATCACCACTCACGACGCCATGCACGGCACCATTGCTCTGCGACACCGACAGCTGAACGACCTGCT
GGGCAACATCTGCATCTCCCTGTACGCCTGGTTCGACTACTCTATGCTGCGACGAAAGCACTGGGAGCACCACAACCACA
CCGGCAGGTCGGCAAGGACCCCGACTTCCACAAGGGCAACCCGGACTGGTGCCTGGTTCGCTCTTTCATGTCTCTCT
TACATGTCTCTGTGGCAGTTCCCGGACTGGCCTGGTGGGCGCTGTGCAGATGCTGGGCGCTCCCATGGCCAACT
GCTGGTGTTCATGGCCGCTGCTCCCATCTGTCCGCTTCCGACTGTTCTACTTCCGACACTCCCTCACAAGCCCG
AGCCTGGACCTGCCCGGATCTCAGGACATGGCCTGGTTCGAGCCAAGACCTCTGAGGCTTCTGACGTGATGTCTTTC
CTGACCTGCTACCACTTTCGACCTGCATTGGGAGCATCATCGATGGCCCTACGCTCCCTGGTGGCAGCTCCCTCACTGCCG
ACGACTGTCTGGCCGAGGACTGGTCCCCGCTCTGGCCTAAAGCTGCTTGTACCTAGTGCAACCCAGTTTGTAAAAATTA

BvertW

CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACC GCAGTCCGCTGTACACCCATGTGCGGTGTGGTTCCTCAACCAGG
CCCTTATCGGCTTGACCCTGGCCGACTCATTGCTGCTGCTTGGCTTACTCTGCATATCTACGGTGTCTACTTCCATCGA
TGGACCATCTGGTCCGTGCTTACAGTCCCTCTTATTGTGGCTGGGCGACTTGGTGTCCGTCGGCCTGTTTCATCGTTGC
CCACGACGCCATGCACGGCAGCCTGGCTCCCCTAGACCACGCCTCAACACCGCCATTGGATCTCTGGCGCTGGCGTTGT
ATGCTGGTTTTTCGGTTCACCCCGCTCAAGACGGCCATCATGCTCACCACGCCGACCTGGAACCTGCCGATGATCCCGAC
TTTCATGCGGATGCTCCCCGGCCTTCTGCCGTGGTTCACGGCTTCTTCCGAACCTACTTTGGATGGCGAGAGCTGGC
GGTGTGACTGTTCTGGTGGCCGTCGAGTTTTGATTCTGGGAGCCCGAATGCCAATCTCCTTGTATTCTGGGCCGCC
CCGCACTGCTGTGCGCTCTACAACCTGTTTACCTTTGGTACGTGGCTCCCCACAGACACACCGACGACGATTCCTGAC
AACCACAACGCCCGTACTTACCTTTTGGCCCTGTGCTCAGTCTACTGACCTGCTTCCACTTCCGCCGACATCAGGAACA
CCATCTGACACCATGGAAGCCTTGGTGGTCCCTGTTCTCTTAAAGCTGCTTGTACCTAGTGCAACCCAGTTTGTAAAA
TTA

AspertW

CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACC GCAGTCTGGTCGGAAACCGGGAACAACCTGGCGATAACCATTGTCA
ACCTGGGTCTGACCGCTGCAATTCTCTTGTGCTGGCTCGTGTGTCACGCCTTACCCTCTGGTTGCTCGACGCTGCCGCC
CATCTCTGCTGGCCGTTCTGTGTCTGGCGGGTCTAACCTGGCTTTCTGTGCGGTCTTTTCATCATCGCGCAGGATGCCAT
GCACGGCTCGGTGGTTCCCGGACGACCTCGTGCCAATGCAGCCATTGGCCAGCTGGCTCTGTGGCTGTACGCCGGCTTCT
CATGGCCCAAGCTGATTGCCAAGCACATGACCCATCACAGACATGCTGGAACAGACAACGACCCCGACTTTGGTCATGGA
GGACCAGTGAGATGGTACGGCAGTTTTGTCTCCACCTACTTTGGATGGAGGGAAGGCCTGCTGTTGCCGGTCATTGTAC
GACATATGCTCTCATCTTGGCGACCGATGGATGTACGTGATCTTCTGGCCTGTTCTGCTGTATTGGCCTCCATCCAGA
TCTTTGTGTTTGGCACTTGGTTGCCTCATCGACCCGGCCACGACGACTTCCCCGATCGACACAACGCTCGGAGCACTGGT
ATTGGAGACTCTCTCGCTGCTCACGTGTTTCCACTTCCGGGGCTACCACCACGAGCACCATCTACATCTCAGTGCC
TTGGTGGCGACTCCCTCGCACTCGAAAGACCGGAGGTCGTGCATAAGCTGCTTGTACCTAGTGCAACCCAGTTTGTAA
AAATTA

AacrtZ

CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACC GCAGACCAACTTCCCTCATTGTGGTTGCCACCGTCTTGTTCATGG
AGCTGACAGCCTATAGCGTGCATAGATGGATCATGCACGGCCCTTGGGCTGGGGATGGCACAAGTCCACCACGAGGAG
CAGACCATGCTCTTGAGAAGAACGACCTGTATGGATTGGTGTCTGTGCTCATCGCCACTGTTCTATTACCGTGGGGTG
GATCTGGGCACCGGTTCTGTGGTGGATTGCTCTGGGATGACTGTCTACGGTCTGATTACTTTGCTGACAGATGGCC
TGGTGCACCAGCGATGGCCCTTCCGATACATTCTCGAAAGGGCTACGCCGACGCTTACCAGCTCATCGTCTGCAT
CATGCAGTGAAGGCCGAGATCACTGCGTTTTGTTTTGGATTTCATCTACGCGCCACCTGTGGACAAGCTCAAGCAGGATCT
CAAAATGTCTGGAGTACTTCCGGCCGAGGCCAAGAACGGACGTAAAGCTGCTTGTACCTAGTGCAACCCAGTTTGTAA
AAATTA

HpCrtZ

CACGTCATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACC GCAGCTGTCTAAGCTGCAGTCTATCTCTGTGAAGGCCCGACGAG
TCGAGCTGGCCCGAGACATCACCCGACCTAAGGTGTGCTGTCACGCCAGAGATGTTCTCTGGTGGGACTGCGAGTGGCT
GCTCCCCAGACCGAGGAAGCCGTGGGCACCCAGCAGGCCGCTGGCGCTGGCGACGAGCACTCTGCCGACGTGGCCCTGCA
GCAGCTGGACCGAGCCATTGCCGAGCGACGAGCCCGACGAAAGCGAGAGCAGCTGTCTTACCAGGCTGCCGCTATCGCCG
CCTCTATCGGCGTGTCTGGAATCGCCATCTTCCGCACCTACCTGCGATTGCCATGCACATGACCGTCCGGCGAGCTGTG

CCCTGGGGCGAAGTGGCTGGCACCCCTGCTGCTGGTGGTTCGGAGGCGCCCTCGGCATGGAAATGTACGCCGATACGCCCA
 CAAGGCCATCTGGCACGAGTCGCCCTCGGCTGGCTGCTGCACAAGTCTCATCACACCCTCGAACCGGACCTTTTCGAGG
 CCAACGACCTGTTCCGCATCATCAACGGACTGCCCGCCATGCTGCTGTGTACCTTCGGCTTCTGGCTGCCAACGTGCTG
 GGCACCGCTGCTTCGGAGCCGGCCTGGGCATCACCCCTGTACGGCATGGCCTACATGTTTCGTCACGACGGCCTGGTGA
 CCGACGATTCGCCACCGGACCTATCGCTGGACTGCCCTACATGAAGCGACTGACCGTGGCTCACCAGCTGCACCCTCTG
 GCAAGTACGGCGGAGCCCTTGGGGCATGTTCTGGGACCTCAAGAGCTGCAGCACATCCCCGGTGGCCCGAAGAGGTC
 GAGCGACTGGTGTCTGAGCTGGACTGGTCTAAGCGATAA

ERG20^{F88W-N119W}

TCCAAGGCGAAATTCGAAAGCGTGTTCGCCGAATCTCCGAGGAGCTGGTGCAGCTGCTGCGAGACGAGGGTCTGCCCA
 GGATGCCGTGCAGTGGTTTTCCGACTCACTTCAGTACAAGTGTGTGGGTGGAAAGCTCAACCGAGGCTGTCTGTGGTGC
 ACACCTACCAGCTACTGACCGCAAGAAGGAGCTCGATGACGAGGAGTACTACCGACTCGCGCTGCTCGGCTGGCTGATT
 GAGCTGCTGCAGGCGTTTTGGCTCGTGTCCGACGACATTATGGATGAGTCCAAGACCCGACGAGGCCAGCCCTGCTGGTA
 CCTCAAGCCCAAGGTCGGCATGATTGCCATCTGGGATGCTTTCATGCTAGAGAGTGGCATCTACATTCTGCTTAAGAAGC
 ATTTCCGACAGGAGAAGTACTACATTGACCTTGTGCGAGCTGTTCCACGACATTTTCGTTCAAGACCGAGCTGGGCCAGCTG
 GTGGATCTTCTGACTGCCCCCGAGGATGAGGTTGATCTCAACCGGTTCTCTCTGGACAAGCACTCCTTTATTGTGCGATA
 CAAGACTGCTTACTACTCCTTCTACCTGCCCGTTGTTCTAGCCATGTACGTGGCCGGCATTACCAACCCCAAGGACCTGC
 AGCAGGCCATGGATGTGCTGATCCCTCTCGGAGAGTACTTCCAGGTCCAGGACGACTACCTTGACAACCTTGGAGACCC
 GAGTTCATTGGTAAGATCGGCACCGACATCCAGGACAACAAGTGTCTCGGCTCGTTAACAAAGCCCTTCAGAAGGCCAC
 CCCCAGCAGCAGACAGATCCTCGAGGACAACCTACGGCGTCAAGGACAAGTCCAAGGAGCTCGTCATCAAGAAACTGTATG
 ATGACATGAAGATTGAGCAGGACTACCTTGACTACGAGGAGGAGGTTGTTGGCGACATCAAGAAGAAGATCGAGCAGGTT
 GACGAGAGCCGAGGCTTCAAGAAGGAGGTGCTCAACGCTTTCCTCGCCAAGATTTACAAGCGACAGAAGTAG

AaLIS

GCCTCTTTCAACCGATTCTGCGTGTCTCCCTGCTGGCTCCCAACAACCTCTCCCCAGATCTCCAACGCTCCCCGATCTAC
 CGCTGTGCCCTCCATGCCACCACCAGAAGTGGTCTATTACCGAGGACCTGGCCTTCATCTCTAACCCCTCCAAGCAGC
 ACAACCACCAGACCGCTACCGAATTTTCTCCGACGAGTTCTACCTGAAGCACGAGAACAAGCTCAAGGACGTCGACGA
 GCCCTGCGAGAGGTGGAGGAGACTCCCCTGGAGGGCCTCGTCATGATTGACACCCTGCAGCGACTCGGTATCGACTACCA
 CTTCCAGGGAGAGATTGGAGCTCTGCTCCAGAAGCAGCAGCGAATCTCTACCTGCGACTACCCCGAGCAGCAGCTGTTCCG
 AGGTGTCCACCCGATTCCGACTGCTCCGACAGGAGGGTCAACAACCTCCCGCCGACGTTTCAACAACCTTCCGAGACAAG
 GAGGGACGATTCAAGTCTGAGCTGTCCGAGACATTGAGGTTGATGTCCCTCTACGAGGCTTCCAGCTGTCCATTCA
 GGGCGAGGACATCCTCGACCAGGCGCTGACTTCTCCTCTCAGCTGCTCTGTTGGGCTACCAACCTGGACCACCACC
 AGGCCCGACTGGTCCGAAACGCTCTCACCCACCCCTACCACAAGTCCCTCGCCACCTTCATGGCTCGAAACTTCAACTAC
 GACTGTAAGGGCCAGAACGTTGGGTCAACAACCTCCAGGAGCTCGCCAAGATGGACCTGACCATGGTGCAGTCTATGCA
 CCAGAAGGAGGTCTCCAGGTGTCCAGTGGTGAAGGGACGAGGTTGCTGCTAACGAGCTGAAGCTCGTGCGAAACCAGC
 CCCTGAAGTGGTACATGTGGCCTATGGCCGCTCTCACCGACCTCGATTCTCTGAGGAGCGAGTGCAGCTGACCAAGCCC
 ATCTCCTTCATCTACATCATTGACGACATCTTCGACGTGTACGGAACCCCTCGAGGAGCTGACCCTCTTCACCGACCCGT
 CAACCGATGGGAGCTGACCGCTGTGGAGCAGCTCCCTGACTACATGAAGATCTGCTTCAAGGCCCTGTACGACATCACCA
 ACGAGATTGCTTACAAGATCTACAAGAAGCACGGACGAAACCCATTGACTCTCTCCGACGAACTGGGCTCCCTGTGT
 AACGCTTTCCTCGAGGAGGCCAAGTGGTTTCGCTTCTGGCAACCTGCCAAGGCCGAGGAGTACCTCAAGAACGGTATCAT
 TTCCTCTGGAATGCACGTGCTGACCGTCCACATGTTCTTCTGCTCGGCGGTTGTTTACCGAGGAGTCCGTCAACCTGG
 TGGACGAGCACGCCGGTATCACCTCCTCTATCGCTACCATTCTGCGACTCTCTGACGACCTCGGATCCGCCAAGGACGAG
 GACCAGGACGGATACGACGGCTTACCTGGAGTGTACTCTCAAGGACCACAAGGGTTCTCTGTGAGAACGCCCGAGA
 GGAGGTCATCCGAATGATTTCCGACGCTTGGAAAGCGACTGAACGAGGAGTGCCTGTTTCCCAACCCCTTCTCTGCCACCT
 TCCGAAAGGGATCCCTGAACATCGCTCGAATGGTGGCCCTCATGTACTCTTACGACGACAACCACAACCTGCCCATCTCT
 GAGGAGCACATGAAAACCATGCTGTACGACTCCTCTTCTAA

CrGPPS

GTCGTGCGAGAAGTCCCAAAATTAGCCAGCGCAGCAGAATACTTTTTCAAGCTGGGCGTTGAGGGCAAGCGATTCCGACC
 CACCGTCTTCTGCTCATGGCCACTGCCATCGACGCCCCATCAGCTCGAACTCCCCCGACACTTCCCTTGACACCCTGT
 CCACCGAGCTGCGACTCCGACAGCAGTCCATTGCCGAGATTACTGAGATGATTGATGTTGCTTCTCTGTTGCATGACGAC
 GTGTTGGACGACGCTGAGACTCGACGGGGCATTGGCTCTCTCAACTTCGTTATGGGCAACAAGCTCGCTGTCTCGCGGG
 CGACTTCTGCTGTCTCGGGCGTGTGTTGCGCTGGCGTGCCTAAAGAACACCGAGGTTGTTAGCTACTAGCGACCGTTG
 TCGAACATCTGGTACCAGGCGAAACCATGCAGATGACCACCCTAGCGACCGAGGTTGTTCCATGGAGTACTACATGCAG
 AAAACCTACTACAAGACAGCGTCCCTGATTTCCAACCTCTGTAAGGCTATTGCTCTGCTCGCTGGCCAGACCTCCGAGGT
 CGCCATGCTCGCTACGAGTACGGCAAGAACCTCGGCCTCGCCTTCCAGCTCATTGACGACGCTCTCGACTTACCAGGAA
 CTTCCGGCCTCGCTCGGAAAGGGATCCCTCTCCGACATTCCGCATGGAATTGTACTGCTCCATTCTGTTGCTATTGAG
 GAGTTCCCGAGCTGCGAGCTGTGGTGGACGAGGGATTGAGAACCCCTACAACGTGGACCTGGCCCTGCATTACCTTGG
 AAAGTCCCGAGGAATCCAGCGAACACGAGAGCTTCCATCAAGCATGCCAACCTGGCCTCTGACGCCATCGACTCTCTGC
 CCGTGACCGACGATGAGCATGTCTCCGATCTCGACGAGCCCTCGTCGAGCTCACCCAGCGAGTACATCACCCGACGAAAG
 TAG

IntB11Up

CACGTGATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCAGCGCTCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGTT
 ATGCCGGTACTGGGTCTCTGCCTGCGGCCGATTTAAATATCAGCTATCGAACACCCATTTACCATGTCTCTACTCCTA
 CTATAGCCCGTGGTGACCGGCTACCTACAGTACATAGGCTACAACCATGAGTAGACCTAAGACAGCCACAGACCAAGGTT

CGGCTAAGAACAAGTTGCTGGAGGAGTCCGTCGATCGTTTTCCGTGGCAACGAGCACATGCGATTCAACTTTTACGAGCCG
 TTTGTGGTCTTAATCTGGTGTGCAGCATCTGTTTCCATGGAGGTTTTACTTCTTGATCCTCAACTCTCGATCAGAACAG
 CTCCAGATGAGGGTCCGATTTTTTTTCTGGCCTCTGCGTAGATCAGGGACCCGTGATTTGGGCCCGGTTCTTTCTGCCAA
 AGTTTTGCTTACTTTCTACAATTGTAGCCCGTTTGGAGGTTTGGATCCCCTTCTCCCCACCCTAACCGATCGG
 TTTACCGTTAGGCTTCATGTGCATCTTAGTAGCAACCTACAAGCAGGGAGAGCTGCCATTTCCAGAAGCCCTAGCCCGAG
 GAGATGCAGAGTATCCGCATGGCCCTAGTCATTCCGGCCTTTGGTTGAATGTATGTTTGTGAGTGTGTGACTCTAATT
 GGCTCTACCGATAGTCTACACCTGCTAGTAGGTAGAGACCGGCGCGCCTATCAAATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAGT
 AGCGCTCACGTG

IntB11Dn

CACGTGAGCGCTGTGACTATTAACATCAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGGTCTCTGAGTACTAGCAGGTGTA
 AGAAGTTGGTGAAAACATTTACGCCTAAAACCCGAACATTGTCTCAGAGCCCTTAATATCGGTACAAACCCCTGGAAAGC
 CCAATCAGGTTTACAGTCAAACTCTCTCCACGGCTACGTGCTGCTAATGGAGAGCATGGATTGTGGGGGTCCGTGAGA
 GTGTCTCGATGCTCCACAGCCCGTCTACAAGTAAAAGTACTGGTACCGTACAAGTACAGGGTGGACCGGGATATTCGAA
 TTCTCTCACACTCTGTGTTTTTTTTGGTCATTTCTTTTCTCTCAATCACTACTTGTAGCACGTTTTCATCTACAAGACA
 TGGCATGCCAGAGCAAGGTGTGCGCACAAGATAGCTAATATAAGACACCAGAGCAAGGGCCGAAAAAGAAATTTCTACCA
 CGCTAAAAGCAAATGCGCAAGAAAAAACCAAGCTGCATTCTGAACTGTTCCAGCTGCTTTGCAATACTGCTTTATTG
 CAGCGGTCAATGTAAGTTGCTCTACCACATGTTACATGATAAATTGAAGATGAAACGGCCTATACGAATCTGGGAGAGT
 ACAGTGTACAAGGCGTGTGAGTACTCCAAGTACAGTAGGCTCTTGAGGTTAGCCACCCCAACCCATTTAAATGCGGCC
 GCTGCGAGAGACCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTTCGCGACGCGAGAGCGCTAGCTTGGCGTAATCATGGTCA
 TAGCTGTTTTCTGTGTGAACACGTG

IntC3Up

GCGGCCGCAATTAATATCGAGCCCTGACTCGAAGTGATTGAGCGACAAGGAGAATGAAGGCTGGATAGTAGTCATCTA
 TGACAGTATTGATTGTATGACAGAGCATTAAATTGAATATAAAAAGTATCAGTTGATTCAATGTCTGAAATGAGAGT
 GTCAGGTTTTCAATAGTAGTATACCGCCGCTGTGTATTAACACAGATAGACAAGCCGTGTCAGATAGACCTTTTCAACCACT
 TCTAGCTGGTGAAGGTGCTTCTGATCTTCATATTGTCCAGGTAACAAGTTGTAGAGTCGAGATATGCCAATGGGATC
 AAGACTAGTGGCAAATGGCAGGTTTTAGCCCTCTCATCTGCAGAACTGTTTATCTGACAACCTGCGGAGATCGCAGACAT
 TGCAGACATTGCAGTAGATGTTTTCAAATGGTACTAAGAATATGGGCAGATGGAGCCATAAGAGTTAGGGATTGATTTT
 TGTGGGTACGAAAAAGCACTCAATATAGGTTGCTTTTATTACGATATCGTTGTTACTAATTTGGCTCTACCGATAGTCT
 ACACCTGCTAGTAGGTAGAGACCGGCGCGCCTATCAAATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAGTTTAAATTAAGACCGGGT
 TGGCGGC

IntC3Dn

GAGGGCTCTGTCACTCAGTGTGACTATTAACATCAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGGTCTCTGAGTACTAGC
 AGGTGTAAGAAGTTGGTGAAAACATTTACGCCTAATACAGTTGTAGAAACCAGACGGTGAAGGGTTATCTAGATGGCTGA
 AAATCACGATTGAAGATACAGAGTTGTAACCAGAGAAAACAAGAAACAAAAAACAACCAAAAAACCGTATAATATCCC
 CTTGAAACATTACGCGACTTGATATTATCTCTGGATGAGATTTCTGAGGACTTTTACCATCCTAAAGTCACACATTCATC
 CTCAGCAAAAAACCATAGATTGGGTACGGAGAGTATATTAGAGCTCCCTAGATGTCACATGACTCTGGATGGACTCAT
 CCATGCTCTTTTACCAGCTTTACTCATTGAAAAATGTACTTGTCTTGTACTCTTGGTCGACTACAACCTTTTACAGACCA
 TATTGATCGGGTCCATTTTTTAAACATTTTTTAAACAGAACAGATAAAATGTCAATAATGGTATCAAAAAGATGGGTAGA
 TTCTAGCGATCATAATGGTGAATTAACACTCAATTATCACAATATTCAGCAAGTTGAGTGAATTTAAATGCGGCCGC

IntC13Up

CACGTGATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCAGCGCTCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTT
 ATGCCGGTACTGGGTCTCTGCCTGCGGCCGCATTTAAATCACGTATATGACGATCTTGCTCCAAGTGCCAAGTACATACT
 CGCACGGGAAAGTTCCATATAACCGAGTATGTGAAACAGTCTTGCTGGACCTGTTCTTTCTTTGTGAGACAGAAGGAGG
 AAGATCAAGTGAATGACGTAGAACAATGGGGGGAGGGCAGTTGAGTAGAATGTTCAAAAACGGAAGCTGTCCAATCAGA
 AGCGTCTGCACTCAATCATGTGGTATTGTTGAGTTGTTATCGTCCGTTTCGTCACGACGAGGGCTCATGTACGGTACA
 GGGGGCTTTATCATTACATGTGCAGCTATCTCTGTTATGTTACCGCAATGAGAGTAAGCGGCAGTGTGTTGATGTAAGC
 GGAGTAAGCGATATTACAGCGAAGTCGCTTGGGCGTTTGGTGCGGCACGGGCCATTTGGTGTCTAAACGGAGATGTTGA
 CCCTGGCTCTAGTATAAGGGATATTGACATACGACTACCGTATATATCCGAGTCTACAGTGTACTATCACAGCACATGTC
 GTTCTGAACCTCGAGGAATGTCGCTGGTGGTGACAATAATTGGCTCTACCGATAGTCTACACCTGCTAGTAGGTAGAGAC
 CGGCGCGCCTATCAAATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAGTAGCGCTCACGTG

IntC13Dn

CACGTGAGCGCTGTGACTATTAACATCAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGGTCTCTGAGTACTAGCAGGTGTA
 AGAAGTTGGTGAAAACATTTACGCCTAATTAAGTGGCCAGTGTGGTACTGATGTTAGACAATGGGAGAGTATGAGCTA
 CGGCTCCCAAGTAAAACATCCACGCTCGCACTACCCATACACTCCAACAGCTGAATTTGGCCAGGCACAAGGAGAAGCA
 CTGAGCCCGCTGTATGTACGCCACTTACTATACAATGATGCACACAGTCATCTTTCCGGAACACCGGTGAATGCCGGC
 ATGCCGTTTTCAAATGCCGCGAGTGGACCAATAACAATAGAATAGTGCAGCCAGCCGCTACAGCAAGTACAATGTGGT
 GGTTGTACAGTACTTATTACGCCGTGGATCTCAAGTCCGAAGTAGGAGTATGAGTAGAATACTTTTGTCCATTCGTGAG
 AGACTCTCCACCCTCTGTATATTATCACGGACATAAATTTGTACGGGGTTTCGGGCCGGTACAGTACAGTACAACCCCTA
 TACTCGTATCGTAATACATACAGGCTTGTAAATCCACGGTTTCTACTTGGCTCTCTCTCAATTTAAATGCGGCCGCTGCGA
 GAGACCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTTCGCGACGCGAGAGCGCTAGCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGT
 TTCCTGTGTGAACACGTG

IntC14Up

CACGTGATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCAGCGCTCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTT
 ATGCCGGTACTGGGTCTCTGCCTGCGGCCGCATTTAAATAGCTAGTCTCAGTGTAGTAAAAAGTGGTGGTAGGAGTTGAGG
 TGGTAGAAAGAGTTGTTTTGATGGGTAGATCAAGGAGTCATGAAAGGAGTCAAGGCAGAAAAAACGATACCAGTTGATT
 TGGATCACTGCATAAATTCGTTAATCAACTCCAGAATTCATTTTTCTCCCTTCTATCCATTGTAATCTCTTTCGTTCAAC
 ACTTCCATGCACCGCACCCAGCAGACAAGTCCCGTTCCGTTAAACCAAATAGGAGGTTTCAATGGAGAGTGGAGATGATTT
 TACCCGATATTAGTCTTTTTTCCAGCCTTGATTAAGTCAACAGCTCCTAGACACGAATATAGACTTGAACGGTCATTT
 GAAGTACATTAGTTACAATACATGTACATACTGTTATCATATGTTAAGGGTGAAGTCAAGAAACAATATTGAACAAATAAT
 TACCTGACATAGTTACATTTAACACACTCTCTTAGTGACGATTCTGACACGAAGGCCACTTTCTGTTTCATGCTTGCAGTT
 TCATCAGTCTCTCCTAACCACTATAATGAACCCACAGGGAAACTGGTTAGGTCGAAATCATTATAAATATCAATGAAA
 CAATCGACTAATACTTTACTTTCTGTCTCTACAATTCATTAGCCTAATTGGCTCTACCGATAGTCTACACCTGCTAGTAGG
 TAGAGACCGGCGCCTATCAAAATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAGTAGCGCTCACGTG

IntC14Dn

CACGTGAGCGCTGTGACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGGTCTCTGAGTACTAGCAGGTGTA
 AGAAGTTGGTGAACATTTACGCCTAATAGCTCTAGAGGGAGTTGTTGCGGGACCTCTATATTAGAAGGTGCTACCTTT
 AGGTAGCTGGTTCTCGGGCCGAACGTAGAGATCCAGTTGTTCCCTGAAGCGTCTTATCATATTTGCTTTCTTGTCTGTCCC
 GGGTTTTCTTTGGAGGCAGAATTGAAAGCTCCTTCATCTGTTGATATCAACAGATCTCAGTCTCGGGAGTCAAGGACCGC
 CTGTCCCAACTAGTACAGAAGAGATGGGGTCCACCTGTTCCCTCTTTCTTGAACAGTCAATAACGATTGATCGCACCAT
 TTCTGGAGCCCTTGTACTTCTTGTGCGAGTCTCATCTTGGCCCTCATCTTGGTCAGACATGCTAACTACTATACAGGTC
 GGGGAAATATATCTCATGGTAAACCCCGTCTAAGTGTACCAAATACACCAGTTGATTGAGACTGTTCCAGAAAAACA
 CCCAATGAATTTTTTCCAGCCAAAATTTCACTCTGTCTATAAAGGGAATCGTCACCCTTCTTCTGCATTTCATCTCATC
 TCACTATGCATTAGCGATTTTACAGACACAACCTGGGTTGGTGAGACTCATGATTGAGTGAATTTAAATGCGGCCGCTG
 CGAGAGACCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGTGCGGTTTCGCGACGCGAGAGCGCTAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
 TGTTTTCTGTGTGAACACGTG

IntE6Up

CACGTGATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCAGCGCTCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTT
 ATGCCGGTACTGGGTCTCTGCCTGCGGCCGCATTTAAATAGACACAAGAGCTGCCAGTTTTGCCAATATCAGATCTTTGT
 CAGTCTAGAAGTTGTAGCTTCTGTCCGTACTTTTGTATATTGGTTTGGAGAGGTGCTAACAGTAGTCAATCAGT
 AGCATGCAGCAATTGACGACAACCATTTACGACGGATACTAATGATAGCCACTTTTTCAATGAGTACATCATGAAAGATGG
 CTTGAAAAGTGACATATGACAACAATTGTTATGTACACTGTAGGTACTGTACTGTATGCAGTAAGACATGTGCTAGAAGT
 CATCAATTGACATAATTATCTTGGTGCAGAGGGTCTGACATATAACAAGCCTCTCTGCTGTTTTAAATCAGACTATATTGG
 TCCTATAACCACACCAGGAGTTCACTAAAACCACACCAAATGCCCTTCAAACATTTAAAACACGTTCTTCCCAATTGAA
 CTCCGTCTGGACTCTTTCAAGTCAATGATGTGTGACAAAGGTTGCACCTCGCTGTACACTAATTGGCTCTACCGATAGTC
 TACACCTGCTAGTAGGTAGAGACCGGCGCCTATCAAAATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAGTAGCGCTCACGTG

IntE6Dn

CACGTGAGCGCTGTGACTATTAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGGTCTCTGAGTACTAGCAGGTGTA
 AGAAGTTGGTGAACATTTACGCCTAAGATGGATAAAAATCTGTGACGTGAGAGGTGGGAGGTAGACTTGGTATTTATTT
 ATTTTCATTAGCTATGTGCAGTGGGTTCTACAAGGGCGCTACAAGTAGTTGTAGGGTATGCAAGGAGGGTATATATGCGC
 CGAATAGAAGTATCGGACCCGGAGAGAACGACAAGGAAAAGATAAAGGGTACCTATAGTTCCCATGTTGATACACCGGC
 TCACAGTTGAGGAATGATCACATGCTGGTATCGTTCTGCTGTCTCAATGACGACCATGTCTGTGAGTGTCTCTCAAGCG
 ATGTGGCCAATGCAAGGAGAAAGACGTGGAAGCGGTATCGTACGAGGGCTGGAGTTGTAATATAACTTTAGACAGTCCAA
 AGTAACTGTTTTTGTATCAACCAAGGGCCCTCGGTTATTGTCTTTCGCTTTGGCCAAGATGTCTTTCAGCATGGAATGTA
 CTGCACATACCGAGGATCAGATAATACGAATAAAACGCGCCTCGAGCCCAGATATTTAAATGCGGCCGCTGCGAGAGACC
 GACGCGCTGGGCTACGTCTTGTGCGGTTTCGCGACGCGAGAGCGCTAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCGT
 TGTGAACACGTG

IntE8Up

AAATATGAGGGAGAGGCGACACTGTTGATTGCTTACCAACCCTAACTAACAGCATCTGTAGTCTGTAATCACTGC
 TGTACTGTACATACTGTACTCTCTGCTGTATCGGTATGATGCACCTTTGCTTTTTTACTGTTTGAATTTTTAGGACATGCT
 TCTGAAAGGCATGGGTTGTGCCCTGCCAACCGGTTTTACTCCTTGACAGTGGGTTGCACCTCCAACCCACAAAACAGGTGC
 GAACATGTCTGCTTTCCGAGATCAATTCACGACAGAGGCGATCGGAAACCAAGCTAACAGATGGTAATCATACTGCGCC
 GTGCCACGCTTACAAATCACAATGCACCTACTGTACATACTGTACGATTGTACTAGCAGATACCCCATCTCAACAGCCCT
 GTACACAGCCCCGCTAAACCTACTGTACCATCGCTACTGCAGAGAAGAGGGCTAACCGGAGTTTGTGTTGTGTGGGGA
 GGGTGTGAGATCAGCTCCGA

IntE8Dn

CTTCCAGTTGCCGTACAATGACTCAACCAAATACGTTCAAGCCTGCTTTCAAGCCTGCGTGCTCTTTCTGTCTCATAGT
 TGAACGTAGATCATCTGAGAGAATTTGGCAGACCGTGCAAACACAAGGGTGAGACTGATAGGACACTTGATCTGATCCAA
 AATTTGACAGAGGAAAACACTAGTTTTGAAGTTACTGAACGTTTCTTCTCCAATTGCTTCTAACCCCCCCCCACATAGGTT
 TCGGGGTCTGCCAGAGTTCCGACACAGAGACTTCAAACAAGTAAGTGACGACAAAATATGATCTCTGATGACAACTTGAC
 TTGGCCATATCGCTAAAATACCCACCCTGAACTTTTTGCGTTCCCTTGCATTGTAAAGACCACCTTGTAGATGACCAAAG
 GATGAAACCGCCATTTATAGGCTGCAAACAACAAAAAAGCGACACGAAGCGATTGGCAAGAAATATAGTAGATTGATAC
 AATTGATTTCATCTGTTATTT

IntE12Up

CACGTGATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCAGCGCTCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTT
 ATGCCGGTACTGGGTCTCTGCCTGCGGCCGCATTTAAATATCCCCCTTCATATCCTCTATCATCACATAATACCCCTCCT
 TGGTCCCATTACACCCACCCACAGTGGTATGCTCTCCCCCTCCCCAAAAGTCAAAGCATCCCAAAGTCGACCGTTG
 TACATACCCGTAATACACCTCAGACTGTTGTAATAAATGTGGCTAATTTATGTCCTTCGTTTCTAGGCAGGCGTAATTT
 TAATTTTTTATTTCCCTTTTTTTCCCTACTTTTTCTCCTCTCAAAGTCTATCATCAAGTTATGGCAATCTCGAAGAGATG
 AACGAACGGAAAATAACACAGTTAAAACAGGAAATATATATTTTTCTACTGCTAAAAATGTATCAGAATCCTCTCCTTA
 TTGCTGCGAACAATATCCATCAATCCGATTTAGATCGCATCAATATCCGTCAAGTTGGGGCCATTTCTAGAAACACATG
 CGGCGTTACACTTATTATTCTTTTCCAGCAGAGGTAAAATCAAATAAAATCAATCATAAATTATAAATTAGTTTT
 ATCGAGTCATACGCCGACAGCTAATTGGCTCTACCGATAGTCTACACCTGCTAGTAGGTAGAGACCGGCGCGCCTATCAA
 AATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAGTAGCGCTCACGTG

IntE12Dn

CACGTGAGCGCTGTGACTATTAACATCAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGGTCTCTGAGTACTAGCAGGTGTA
 AGAAGTTGGTGA AACATTTACGCCTAACAGTTGGCCGATTAGGTGTAGTTTATGTTATTTTTCGAGGGCGCAGAATCC
 GCATTTCTCGACGGTTTTTCGCCATCCAGCTCAAATCCCGTCTTGCGCCCGTCGAAAAAGATTTTCTCAATCGTCGACA
 CCTCGAAAAACGTTGTATTCCGCCCCAGAGGTCTGCCAAGACACGTATCTGGGCTCCGAAACATAAAGTTTTACATTTAA
 ACATTTTGGTTATCTAGTTTCAGCGAAAAACCTTGGCAATCCACGTGGTAAATTGAGTTTCGAAAAAAGAATAGAGTTTG
 GTTTTGGCGTGCCAACCGCCAAGAGGTCTCTGCCAAGAGCACGTGCGGATTTGGAAGCTATTGGAGGCGGATGGAGGGA
 TTGAGCGATTGAGGTGATTTTTGGGCGAGATTTTTGTGACATTTTTCAGGTGGATTTTAAAAGGAGGTAAAAATTGGAATAT
 TGGAAAAACTTGC AAACTGGAATTTAAATGCGGCCGCTGCGAGAGACCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGT
 TCGCGACGCGAGAGCGCTAGCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTGTGAACACGTG

IntE16Up

GCGGCCGCGTTTTAAACTCACCGTCGCAACGGACTTGGTTCTACCCACTAGCGCATCCTATCGGACCGTCTGGCCAGTGGT
 ATCTTGCATCTGACAAGCGGTCCAACAGAAATACCGGCTTGGTTTTAGTCTTTCTTTCCGCTAACTGTGCTCAACTATAT
 CTTGGTCCCTTGGTTACTGTGACAAAGCCGCGCTAAGTGGGTCTTGGTTGTCTTAGAAAACCAAAGTATGACTGAAAAAG
 GACGAGATTTGACAAAGTCTCCAGAGGTCTAGGTTGGCGTGCCGTGCGTTACGTTCCGGGTGTAACATCAAAGATACAGCC
 CTTGTGCCGGCCACAAGCAGACAATGCCGAAGCTTTGTTCAAAGCCAGGCTCGTAAGGGAGCTTTAAGGCCATGTGGATA
 ACGTCCAATATCATGTGAGTCCAGTATTAGATGGCCACATATGCACCACCCAGGATAACCCTTAGAGTCCCGTTTACA
 GGTGATTAGAATCATATGCATTGGCTGACATGTGCGTACAGCAGCTTGTGTGTGGTGGAGCTGGGGAGACTGGAGCTAAT
 TGGCTCTACCGATAGTCTACACCTGCTAGTAGGTAGAGACCGGCGCGCCTATCAAATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAG
 TTTAATTAAGAGACCGGGTTGGCGGC

IntE16Dn

AATCTGGCTTGTAGTTGGCGTGACTATTAACATCAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGGTCTCTGAGTACTAGC
 AGGTGTAAGAAGTTGGTGA AACATTTACGCCTAACATATAACTATAACCGACCACACTTTAGTCGGTTTCTTGTCTT
 GTGTACGGTTGTATTGGTTTTACCTGGGGTCCATCGGGTTGTCAATGCAGTTTTCTGGGCTTCTTGGGTTTTTCGGCT
 CGTCAAGTTTTGTTTTCTTGTGTGTGCTATGCACTAACCAACTCCAATAAATTACTTTGACATGCGGCAAGCAGGCTAAT
 TAGACGCACCTAGTTACGCCGGTAACTCCGCATCACCGAAGAAACCAGGGGCGTTCTCGTCAAGGACTTCCGCATTGATG
 TTTCCGTGGCGCGGTGAAAAGTTTTCTCAGCGGACAGCTTTTTGCTTTTTCACTTATTGAAACCCCTTTTTCTCGTCGATAT
 TTTTTCGCTTTGACTTCTCGAGCGTGCCTACATGTACCCAGCGAAGTTTTGTTTTCTTGGCGTAGATCACTGTCTGACAGTG
 GCTGTACCATGCCTCACCTCAGTATAGAGAACGACGAAGCCGAACAAAGGGTACCATAGTTATTAGCGTGGTGTGTGA
 TAGCACACACAGCTACCTATGACCAAGACAGATATTGACAAACCTGCGCGATATTAATTAGCCCAAAGTTGATTTAAAT
 GCGGCCG

IntF11Up

CACGTGATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCAGCGCTCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTT
 ATGCCGGTACTGGGTCTCTGCCTGCGGCCGCATTTAAACTACCAAGAATGACATTTTTCGGTTATCAGTGCTATCACAGTT
 TGCCCTTGTCTCACCATCCACATAGTTGGCGTTTTGTTAGGGTGA AAATCGTTCACTTTTGAACCGAAATGCTACTGTAC
 ACCAGAAGTCCCTGGTATGATACTTACAGTATGTACTGTACGTACCAGAGGCTATTAAGGTCCCAGCACTGCCTGACCAA
 GTCCCAACGAAAGTAGTTACGTCTTGGCCAAACTCTGGTTAAAAGCCGCTAGCGCCAAAGCCTAACTGCATTTCTCTTGA
 GTGGAATAAGATGCCTCGTTCTGGAACAAGATAATACGTAATACGACAGAAAAGGGAATCTAAGCCTCACTGAAAAGGGG
 GAAATACACCGGCCTGAGGGACTTTATGAGGGTATAATTAACTCACGACTCCTTTCTGACATAGGACGTCCGCACCTTTTT
 TTTCTTTCTTTCTTCTGTCACAACATTGCTAAAAGTGCATTTCCCTCCCAACGGGTTTTTCTCGTGTACCCGTAGACGT
 AAGGGTTGCTAATTGGCTCTACCGATAGTCTACACCTGCTAGTAGGTAGAGACCGGCGCGCCTATCAAATGCTTCTCAT
 GAGGTTGCAGAAGTAGCGCTCACGTG

IntF11Dn

CACGTGAGCGCTGTGACTATTAACATCAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGGTCTCTGAGTACTAGCAGGTGTA
 AGAAGTTGGTGA AACATTTACGCCTAAATAGGGGCTGTCTCTACAGTTAAGAAGTATGTAAGACTGCACCCCCGCCACA
 GGTAACTATTACTAAGCGTAGAACCTGGCTTATCTCACTCACGTCTGCCTCTGGCATCTGTCATCTCCATCTAAAACGTC
 ATGAAAAAGTCAATGAATTCATAATGGTGGACCTTGTCAATTAAGCCTCTCTGGCTGTATGATACCCCGGTAGCAGATC
 GACACTCGGGATGACAGCCACAATCGACGATATCAATGTAACCTCTTTCCGTGGAGGCCAGTGCCGTGCATAACCTTGT
 AAGTGACAACTCCGATTATTGATATCACGCAGCTGTGTTATCATCAGTATTGGTAATTGCTTTATCTACCGTACATACC
 CGTGGTTCTTTGTTTTGTTTTCCGATGAGAGCAGTTTATAACCCAGTCGCCGTGATCGGTGTTTATTGTCGATGTGGCT

**TGAAGTCTACATGCTGTACCAGTACAAGCACTGTAGATGCAGAAGTGTAAAACGCGGCCGCTGCGAGAGACCGACGCGC
TGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTTCGCGACGCGAGAGCGCTAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAC
ACGTG**

T_{XPR2}

GGTCTCTAGGTGGCGCGCTATCAAATGCTTCTCATGAGGTTGCAGAAGTGCCACCTACAAGCCAGATTTTCTATTTAC
AACAAATATCTGGTCAAATTTTTCAGTTTTCGTTACATAAATCGTTATGTCAAAGGAGTGTGGGAGGTTAAGAGAATTATCACC
GGCAAATCTGTTAATTGCCTATTAATTAA

P_{TEFin}

**AGACCGGGTTGGCGCGTATTTGTGTCCAAAAAACAGCCCAATTGCCCAATTGACCCCAAATTGACCCAGTAGCGGG
CCCAACCCCGGCGAGAGCCCCCTTACCCACATATCAAACCTCCCCGGTTCCACACTTGCCGTTAAGGGCGTAGGGT
ACTGCAGTCTGGAATCTACGCTTGTTCAGACTTTGTACTAGTTTCTTTGTCTGGCCATCCGGGTAACCCATGCCGGACGC
AAAATAGACTACTGAAAATTTTTTGTCTTTGTGGTTGGGACTTTAGCCAAGGGTATAAAAGACCACCGTCCCCGAATTAC
CTTTCCTCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTTGTCAACTCACACCCGAAATCGTTAAGCATTTCCTTCTGAGTATAAGAATCATT
CAAATGGTGTGATTTTCAGAGGCAGCAGCAATTGCCACGGGCTTTGAGCACACGGCCGGGTGTGGTCCCATTTCCATCGAC
ACAAGACGCCACGTATCCGACCAGCACTTTTTGCAGTACTAACCCGAC**

T_{PEX20}

CGGATCGCGGAAGTGTGGATGGGGAAGTGTGAGTGCCCGTTCTGTGTGCACAATTGGCAATCCAAGATGGATGGATTCAAC
**ACAGGGATATAGCGAGCTACGTGGTGGTGCAGGATATAGCAACGGATATTTATGTTTGACACTTGAGAATGTACGATAC
AAGCACTGTCCAAGTACAATACTAAACATACTGTACATACTCATACTCGTACCCGGGCAACGGTTTCACTTGAGTGCAGT
GGCTAGTGCTCTTACTCGTACAGTGTGCAATACTGCGTATCATAGTCTTTGATGTATATCGTATTTCATTCATGTAGTTG
CGT**

Kan

CACGTGTTAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGGATACCGTAAAGCACGA
GGAAGCGGTGAGCCATTTCGCCCAAGCTCTTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCC
ACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCATGCATCACCATG
GGTCACGACGAGATCCTCACCGTCCGGCATGCGTGCCTTGAGCCTTGCGAACAGTTCTGCTGGTGCAGCCCTGATGCT
CTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGG
TCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGC
AAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCCTTCAGTGACAACGTCGA
GCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCTGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTGCGATTTCATTTCAGGGCACCG
GACAGGTGCGTCTTGACAAAAGAACCAGGGCGCCCTTGCCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGT
CTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGCCGGAGAACCCTGCGTGAATCCATCTTGTTCATCA
TGCGAAACGATCCTCATCTGTCTCTTGTATCAGATCTTGTATCCCTTGCGCCATCAGATCCTTGGCGGCAAGAAAGCCATC
CAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCCGGTTTCGCTGTCCATACAG
TG

T_{Cyc1}

**GACGCAAGAGAAGCCGTCGCCCCACGGAGTATCACTCGTCTAATACAAGCGCTCGTAGAAGCTGAGTGTTAGAACAACT
CGCAACTGATTCTCGCAATTGAATCTCGCGATTGAATCTCGCAATTGAATCTCGCAAGTTGGGTAGATCCACCTCAGTAA
CAGATCCCATTGTACAATACGAACCGCCTACCGACCAAATCTTTAAATAATCAATTGATATATACAGGCTAAGGGTCCAG
TTGTAGACGC**

hrGFP

**TTACACCCACTCGTGCAGGCTGCCAGGGCTTGGCCAGGCTGGTTCAGCTGGGCGATGGCAGTCTCGTGCTGCTCCACGA
AGCCGCCGCTCCTCCACGTAGGTCTTTTCCAGGCGGTGCTGGATGAAGTGGTACTCGGGGAAGTCTTACCACGCCCTTA
GACTTCATCAGGGTGCAGTGTGGCAGCTGTAGAAGTTGCCGCTGTTTCAGGCGGTACACCAGGATCACCTGGCCACAG
CACGCCGTCGTTTATGTACACCACCTCGAAGTGGGCTGCAGGCGGGTGTGATGGTTTTCTTTCATCACGGGCGCTGTTGG
GGAAGTTGCGGCCCTTGTACTCCACGCGGTACACGAACATCTCCTCGATCAGGTTGATGTGCTGCGGATCTCCACCACT
CCTCCGCTCCTCGTAGCGCAGGGTGCCTCGTACACGAATCCAGCAGGGAAGCTCTGGATGAAGAAGTTCGCTGATGTCTC
GGGGTACTTGGTGAAGGTGCGGTTGCCGTAAGGCGGGGCTCAGGATGTGCAAGGCGAAGGGCAGGGGGCGCCCT
TGGTACGCGGATCTGCACCAGCTGGTTGCCGAACAGGATGTTGCCCTTGCAGCCCTCCATGGTGAACCGTGGTTG
TTCACCACGCCCTCCAGGTTACCTTGAAGCTCATGATCTCCTGCAGGCGGGTGTCTTTCAGGATCTGCTTGTCTACCAT**

P_{EXP1}

**TGCTGTAGATATGTCTTGTGTGTAAGGGGGTTGGGGTGGTTGTTTGTGTTCTTACTTTTTGTGTTAGCAAGGGGAAGACGG
GCAAAAAGTGTAGTGTGGTTGGGAGGGAGAGACGAGCCTTATATATAATGCTTGTGTTGTGTTGTGCAAGTGGACGCCGA
AACGGGCAGGAGCCAACTAAACAAGGCAGACAATGCGAGCTTAATTGGATTGCCTGATGGGCAGGGGTAGGGCTCGAT
CAATGGGGGTGCGAAGTGCAAAATTTGGGAATTAGGTTGCGAAGCAAGGCTGACAAGACTTTGGCCCAAACATTTGTACG
CGGTGGACAACAGGAGCCACCCATCGTCTGTACGGGCTAGCCGGTGTGCGTCTGTACAGGCTCCACCCAGGCTCCATG
CCACTCCATAACAATCCCCTAGTGTACCGCTAGGCCGCTTTTAGCTCCCATCTAAGACCCCCCAAACCTCCACTGTAC
AGTGCAGTGTACTGTGTGGCGATCAAGGGCAAGGGAAAAAGGCGCAACATGCATGCATGGAATGACGTAGGTAAGCGG
TTACTAGACTGAAAAGTGGCACATTTTCGGCGTGCCAAAGGGTCTAGGTTGCGTTTTCGCGAGTGGGCGCCAGGCCAAGCCG
CTCCAAAACGCCTCTCCGACTCCCTCCAGCGGCTCCATATCCCCATCCCTCTCCACAGCAATGTTGTTAAGCCTTGCAA
ACGAAAAATAGAAAGGCTAATAAGCTTCCAATATTGTGGTGTACGCTGCATAACGCAACAATGAGCGCCAAACAACACA**

CACACACAGCACACAGCAGCATTAAACCACGATGAACAGCATGACATTACAGGTGGGTGTGTAATCAGGGCCCTGATTGCT
GGTGGTGGGAGCCCCCATCATGGGCTCTCGTCCCGCCGCGGAAACCGGAAACGCTCGAATCTGCCCGCTCATACTCAC
CGAAACGTGTGGGGCTCGAAAAAACGGGCGCCAAACTCSTTAT

ТТЕF

GTTAACGCTGCTTGTACCTAGTGCAACCCAGTTTTGTTAAAAATTAGTAGTCAAAAACTTCTGAGTTAGAAATTTGTGAG
TGTTAGTGAGATTGTAGAGTATCATGTGTGTCCGTAAGTGAAGTGTATTGACTCTTAGTTAGTTTATCTAGTACTCGTTT
AGTTGACACTGATCTAGTATTTTACGAGGCGTATGACTTTAGCCAAGTGTGTACTTAGTCTTCTCTCCAAACATGAGAG
GGCTCTGTCACTCAGTGTGACTATTAAACATCAAAATCAGGTTGCAGAGGTTGGCGCGCCGAGTAGAGACC

2.3. Культивирование в биореакторе

Средне- и крупномасштабные культивирования проводили либо в 3-литровых биореакторах (KF 103/4, Kекlab, Россия) с рабочим объемом 0,75 л, либо в 100-литровом биореакторе (BLBIO-100SJA, Vailun Bio Co., Китай) с рабочим объемом 35 л. Температуру поддерживали на уровне 29,0°C, а концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне не менее 25%. Применяли непрерывное перемешивание со скоростью 500 об/мин. Воздух подавали со скоростью 0,8 л/мин для 3-литрового биореактора и 40 л/мин для 100-литрового биореактора соответственно. Значение pH поддерживали на уровне 5,5 используя двойной контроль с помощью ортофосфорной кислоты и раствора аммиака. Основа всех сред для культивирования содержала 20 г/л дрожжевого экстракта и 40 г/л пептона.

В 3-литровых биореакторах тестировали исходные концентрации глюкозы 5 г/л и 57 г/л. Инокулят выращивали в колбах на 750 мл в среде YPD2 в течение 24 часов и переносили 10% (об./об.) в ферментационную среду. Подпитка содержала 0,7 г/л и 21 г/л гидрофосфата и дигидрофосфата аммония, соответственно, и 522 г/л глюкозы. В экспериментах с оливковым маслом исходная концентрация глюкозы составляла 5 г/л, а все остальные параметры были такими, как описано выше. Оливковое масло 5% (об./начального об.) добавляли три раза двумя способами: 1) в 0 ч, через 76 ч и 123 ч после начала процесса культивирования, либо 2) через 19, 76 и 123 ч после начала процесса культивирования. Более высокие количества оливкового масла 15% (об./об.) и 35% (об./об.) добавляли в 0 ч и 72 ч культивирования, соответственно.

Питательная среда для 100-л биореактора исходно содержала 31 г/л глицерина. Инокулят растили в 10-литровом биореакторе (BLBIO-10SJA, Vailun Bio Co., Китай) в среде YPG3 (10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 30 г/л глицерина) в течение 24 часов и переносили в количестве 10% (об./об.) от среды культивирования. Подпитка состояла из 1,1 г/л и 34,9 г/л гидрофосфата и дигидрофосфата аммония, соответственно, и 756 г/л глицерина.

2.4. Методы анализа

Экстракция и количественное определение каротиноидов. Сухие клетки использовали для количественного определения содержания внутриклеточных каротиноидов. 1–2 мл культуры осаждали, промывали дистиллированной водой, содержащей 0,01% 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола (ВНТ), продували аргоном и лиофилизировали на установке FreeZone 6 Plus (Labconco, США). Лيوфилизированные клетки использовали для измерения сухой массы и экстракции каротиноидов. К 10–15 мг лиофилизированных клеток добавляли 50 мкл стеклянных шариков диаметром 425–600 мкм вместе с 500 мкл ацетона, содержащего 0,01% ВНТ. Клетки разрушали с помощью гомогенизатора Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция) в режиме 5500 об/мин в течение 20 с × 2 цикла. После разрушения клетки охлаждали на льду 1 минуту и центрифугировали 1 мин при 18000 × g, супернатант переносили в новые пробирки. Полученный дербис подвергали экстракции 500 мкл ацетона с 0,01% ВНТ с помощью гомогенизатора еще три раза как описано выше. Полученные экстракты объединяли, определяли общий конечный объем и анализировали с помощью ВЭЖХ.

Для оценки содержания внеклеточных каротиноидов, продуцируемых во время периодического культивирования с подпиткой с добавлением оливкового масла, клетки осаждали с помощью центрифуги Avanti J-26XP (Beckman Coulter, США) при 4040 × g в течение 30 мин, отделяли супернатант и собирали его в 1-литровые контейнеры. К трем объемным частям супернатанта добавляли одну объемную часть хлороформа, встряхивали в течение 1 ч и центрифугировали на Avanti J-26XP при 4040 × g в течение 20 мин. Наблюдалось образование трех фаз: верхней водной фазы, которую удаляли, твердой средней фазы и неполярной нижней жидкой фазы. Неполярную жидкую фазу и твердую среднюю фазу перемешивали и переносили в полипропиленовые пробирки объемом 50 мл. После центрифугирования на Centrifuge 5804R (Eppendorf, США) при 3840 × g в течение 15 мин отделяли твердую фазу. Неполярную жидкую фазу из каждой пробирки объединяли и смешивали, определяли конечный объем и полученный хлороформный экстракт подвергали анализу ВЭЖХ. По 250 мг твердой фазы из каждой конической пробирки переносили в центрифужные пробирки, добавляли 300 мкл стеклянных шариков и 500 мкл хлороформа. Затем проводили гомогенизацию с использованием гомогенизатора Precellys 24 в режиме 5500 об/мин по 20 с × 2 цикла, полученные экстракты центрифугировали в течение 1 мин при 18000 × g, супернатант переносили в новые пробирки. Полученный дербис подвергали экстракции 500 мкл хлороформа с помощью гомогенизатора еще два раза как описано выше. Экстракты объединяли и анализировали с помощью ВЭЖХ. Общее

содержание внеклеточных каротиноидов рассчитывали, как суммарное содержание каротиноидов в неполярной жидкой фазе и интерфазе.

Анализ экстрактов каротиноидов методом ВЭЖХ проводили на системе Waters (Waters, США) с колонкой WAT086344 C18 (3,9×150 мм, 4 мкм, 60 Å) (Nova-Pak, США). Условия ВЭЖХ: скорость потока 1 мл/мин, 90:10:10 (об./об.) ацетон:вода:метанол (Яшхим, Россия) в качестве подвижной фазы, детекцию проводили при 470 нм на диодно-матричном детекторе (UltiMate 3000 VWD-3000, Dionex, The Thermo Scientific, США). β-Каротин, кантаксантин и астаксантин идентифицировали и определяли путем сравнения времен удерживания и использования калибровочной кривой для стандартов β-каротина (Supelco, США), кантаксантина (Sigma-Aldrich, США) и астаксантина (Sigma-Aldrich, США).

Оптические изомеры астаксантина определяли, как описано ранее (Abu-Lafi *et al.*, 1999), с использованием хиральной колонки Pirkle с L-лейцином (Regis Technologies, США). DSM Carophyll Pink (ранее Hoffmann La Roche Carophyll Pink) использовали в качестве источника синтетического астаксантина.

Измерение содержания линалоола. Клетки из культуральной жидкости осаждали при $3841 \times g$ в течение 5 мин. Органическую фазу с изопропилмирикатом (ITW Reagents, Германия) (экстракт) отбирали для анализа ГХ/МС. 20 мкл образца экстракта изопропилмириката добавляли к 130 мкл гексана. Концентрацию линалоола в органической фазе определяли с помощью системы ГХ/МС на приборе «Maestro» (Interlab) (ГХ Agilent 7820A и МСД 5977, Agilent Technologies). Условия газохроматографического разделения были следующими: начальная температура колонки 70°C в течение 2 мин и нагрев до 260°C со скоростью нагрева 15°C/мин; затем нагрев до 320°C со скоростью нагрева 30°C/мин и выдержкой при 320°C в течение 1 минуты. В качестве газа-носителя использовали гелий. Пробы вводили с разделением потока 1:5. Регистрацию масс-спектров проводили в режиме полного сканирования диапазона 35-300 а.е. масс. Температура испарителя - 270°C. Температура интерфейса поддерживалась 280°C, температура квадруполя - 150°C, источника - 230°C. Ионизацию проводили с помощью электронного удара, энергия ионизации составляла 70 эВ. Объем вводимого образца составлял 1 мкл. Осажденные из культуральной жидкости клетки дважды промывали 50% (об/об) этанолом, центрифугировали при $3841 \times g$ в течение 5 мин и лиофилизировали в системе FreeZone 6 Plus (Labconco, США). Лيوфилизированные клетки использовали для измерения сухой массы.

Микроскопия. В качестве образцов для микроскопии использовали жидкую культуру клеток, предварительно отмытые водой клетки и масляную фазу. Для анализа использовали световой микроскоп МБИ15-У4.2 (ЛОМО, СССР) с масляным иммерсионным объективом

(увеличение - $\times 90$). Анализ анизотропных микрообъектов в культуре клеток проводили в поляризованом свете.

Измерение содержания сахаров. Для анализа использовали супернатант, полученный после удаления осажденных клеток. Концентрации глюкозы, сахарозы и фруктозы определяли с помощью системы ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США) с рефрактометром (RefractoMax 521 Refractive Index Detector, Thermo Scientific, США) и колонкой YMC-Pack Polyamine II 250 x 4,6 мм I.D (температура колонки 50°C) (YMC, Япония). Состав подвижной фазы - 200:125:10 (об./об.) ацетонитрил:вода:этилацетат. Скорость потока составляла 1,5 мл/мин, время анализа - 6-10 мин, температура колонки 50°C. Детекцию проводили при 210 нм. Образцы идентифицировали, сравнивая времена удержания образца и стандарта. Также, концентрацию глюкозы анализировали с использованием анализатора лактата и глюкозы Biosen - EKF (Diagnostics, Германия).

Анализ активности промоторов. Активность промотора pAraDH2 *Y. lipolytica* измеряли с помощью репортера, в качестве которого использовали ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок *Renilla* (hrGFP) (Barth, Gaillardin, 1997). Частота кодонов в последовательности гена была адаптирована для *Y. lipolytica*. Посевную культуру штамма GF1 растили в жидкой YPSuc2 среде в течение 24 ч. Затем инокулят вносили в пробирки с 5 мл свежей среды (YNBSuc, YNBD, YNBSuc/Fru, YNBSuc/Man или YNBSuc/Sorb) так, что исходный титр клеток составлял 3×10^5 кл/мл. Пробирки культивировали в течение 16 часов при 275 об/мин и 30°C. Затем из каждой пробирки по 100 мкл культуры переносили в лунки 96-луночного планшета (№ 665096, Greiner Bio-One, Германия). Планшет инкубировали в флуориметре CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) в течение 24 часов при 30°C и 500 об/мин. Интенсивность флуоресценции и OD₆₀₀ измеряли каждые 60 минут. В качестве контроля использовали лунку со 100 мкл соответствующей среды без клеточной культуры. Для возбуждения флуоресценции использовали свет с длиной волны 495 нм, испускание измеряли при 535 нм. Коэффициент усиления фотоумножителя автоматически контролировался функцией расширенного динамического диапазона. Измеренные значения были нормированы на время накопления 1 с. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения MARS (BMG Labtech, Германия). Значения контроля вычитали из значений OD₆₀₀ и интенсивности флуоресценции (FLU). Для каждой временной точки скорректированные значения FLU делили на соответствующие значения OD₆₀₀, чтобы нормализовать FLU на клеточную массу для каждой лунки. Для исключения значений автотофлуоресценции биомассы и питательной среды в ходе анализа из полученных значений всегда вычитали значения

интенсивности флуоресценции родительского штамма (ВКПМ Y-4967), который не содержал ген *hrGFP*.

Методы работы *in silico*. В процессе работы использовали различные базы данных, NCBI (National Center for Biotechnological Information), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; BioСус, <https://biocyc.org/>; UniProt, <https://www.uniprot.org/> и другие. Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали программное обеспечение: Vector NTI Advance 10 <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>.

Статистическая обработка. Эксперименты проводили по меньшей мере в трех биологических повторностях. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью программного пакета Excel (Microsoft Corporation, США). На рисунках и в таблицах приведены среднеарифметические значения и их стандартные отклонения. Данные визуализировали с помощью SigmaPlot (SYSTAT Software Inc., США) и Visio (Microsoft Corporation, США).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Совершенствование системы редактирования генома дрожжей *Yarrowia lipolytica*

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

В связи с тем, что конструирование штаммов продуцентов сопряжено с множественной последовательной интеграцией и/или инактивацией целевых генов, возникает необходимость в эффективной системе редактирования генома. Традиционный метод редактирования предполагает встраивание экспрессионной кассеты совместно с маркером, который перед следующим раундом интеграции необходимо удалить с помощью системы Cre-Lox посредством сайт-специфической рекомбинации (Fickers *et al.*, 2003). Одним из способов опустить этот время- и трудозатратный этап является переход от отбора рекомбинантов с помощью селективных маркеров и прямого отбора к негативной селекции, направленной против нерекомбинантов, с использованием системы CRISPR-Cas9.

Принцип работы системы редактирования на основе CRISPR-Cas9 подразумевает использование CRISPR-ассоциированного белка Cas9 в качестве эндонуклеазы, которая, связываясь с единой направляющей РНК (sgRNA), вносит двунизовой разрыв в области сайта узнавания. В свою очередь, единая направляющая РНК состоит из направляющей CRISPR-РНК (crRNA) и транс-кодируемой CRISPR-РНК (tracrRNA) (Schwartz *et al.*, 2017). Сайт-мишень на ДНК по принципу комплементарности определяют 20 нуклеотидов 5'-концевой последовательности crRNA, которые описываются формулой 5'-N₂₀-NGG-3', где N обозначает любой нуклеотид, а NGG – смежный мотив протоспейсера (PAM). Белок Cas9 распознаёт PAM, и, в случае комплементарности прилегающей к PAM ДНК, вносит двунизовой разрыв. Репарация такого разрыва может осуществляться путем негомологичной рекомбинации, при которой с высокой частотой возникают делеции или инсерции нескольких нуклеотидов, что может приводить к инактивации гена. Альтернативный способ репарации - гомологичная рекомбинация, для которой необходимо введение нуклеотидной последовательности с участками гомологии к локусу, в котором находится разрыв. Такой последовательностью может выступать генетическая кассета с нативными или гетерологичными генами, которые после завершения процесса репарации окажутся интегрированы в выбранный локус на хромосоме.

В настоящей работе эффективность инактивации генов традиционным методом и с помощью CRISPR-Cas9 системы редактирования была оценена на примере гена *YIACL2*. Для инактивации гена *YIACL2* традиционным методом была сконструирована плазида pUC-fYIACL2-URA3lox как описано в (Yuzbasheva *et al.*, 2020b), содержащая селективный

маркер *URA3*, кодирующий оротидин-5-фосфатдекарбоксилазу, фланкированный последовательностями, гомологичными областям, расположенными выше и ниже *YIACL2* (Up и Down). Эту конструкцию (*fYIACL2-URA3lox*) трансформировали в штамм *Y. lipolytica* W29(Ura⁻), ауксотрофный по урацилу. Частоту встраивания кассеты *fYIACL2-URA3lox* в хромосому посредством гомологичной рекомбинации в результате двойного кроссинговера с заменой дикого локуса (схема рисунок 4), оценивали по восстановлению прототрофности по урацилу.

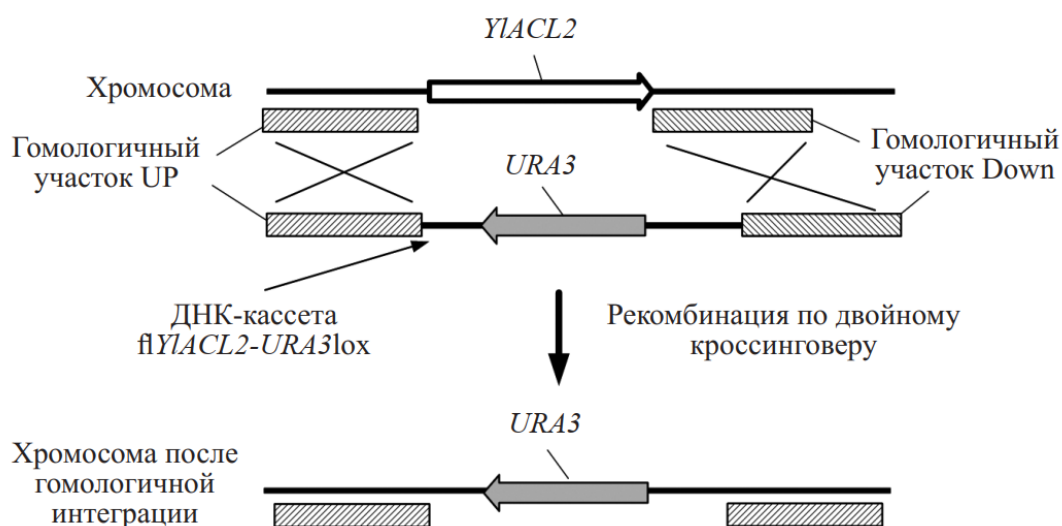


Рисунок 4. Схема эксперимента по инактивации гена *YIACL2* путем встраивания генетической конструкции *fYIACL2-URA3lox* в локус на хромосоме *Y. lipolytica* (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

Исходя из предположения, что штамм, лишенный гена *YIACL2*, кодирующего АТФ-зависимую цитратлиазу, будет отличаться дефектом или отсутствием роста на минимальной среде, содержащей цитрат в качестве единственного источника углерода, 24 отобранных трансформанта были протестированы на агаризованной и в жидкой среде YNBCitr (рисунок 5, 6). Среди 24 проверенных трансформантов был найден один, обладающий таким фенотипом. Для данного трансформанта инактивация *YIACL2* и успешная интеграция кассеты *fYIACL2-URA3lox* в целевой локус на хромосоме были подтверждены ПЦР-анализом. Остальные трансформанты, предположительно, содержали кассету в случайных локусах генома и образовались в результате негомологичной рекомбинации. Таким образом, эффективность инактивации *YIACL2* традиционным методом составила 4%.

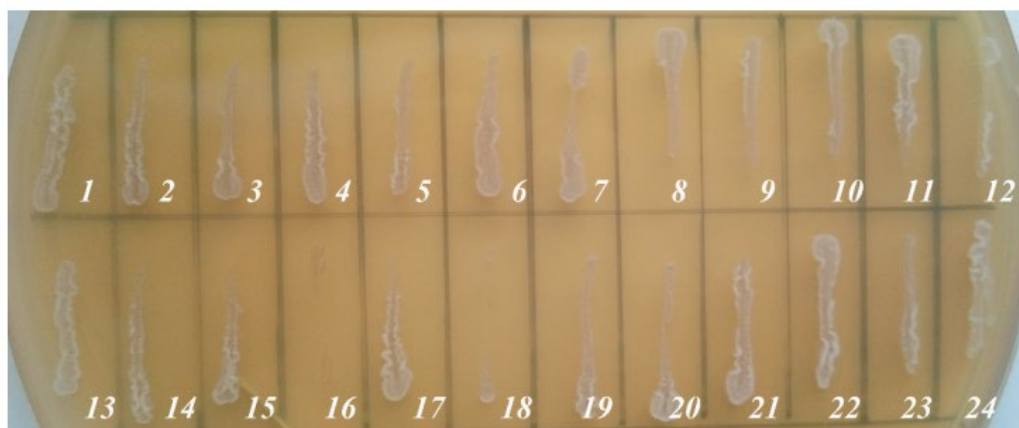


Рисунок 5. Фенотип прототрофных по урацилу трансформантов (1–24), отобранных в результате трансформации штамма *Y. lipolytica* W29(Ura⁻) кассетой flY1ACL2-URA3lox, на агаризованной среде YNBCitr, содержащей цитрат в качестве единственного источника углерода (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

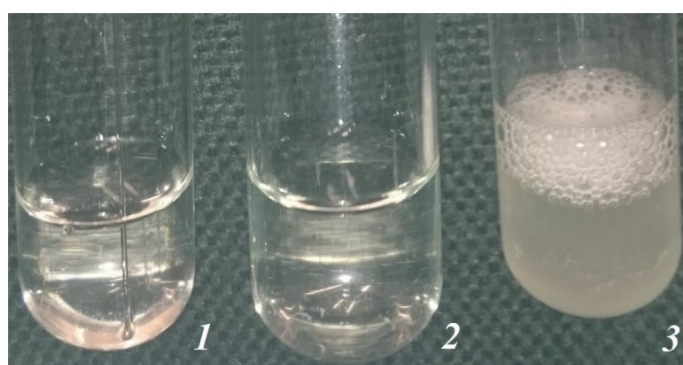


Рисунок 6. Фенотип рекомбинантов, несущих мутацию $\Delta Y1acl2$, в минимальной жидкой среде YNBCitr с цитратом в качестве единственного источника углерода (1, 2). Культуры растили при 30 °С в течение 4 сут. Пробирки засеивали до начального титра клеток $3 \cdot 10^5$ кл/мл. 1 – штамм W29 $\Delta Y1acl2$, полученный посредством гомологичной рекомбинации с использованием конструкции flY1ACL2-URA3lox; 2 – штамм W29 $\Delta Y1acl2$, полученный с помощью CRISPR-Cas9 системы редактирования генома; 3 – контрольный штамм W29 (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

Затем, ген *Y1ACL2* инактивировали с помощью системы CRISPR-Cas9. Для этого была сконструирована плаزمида pCRISPR-hph-sgY1ACL2 как описано в (Yuzbasheva *et al.*, 2020b), несущая ген, кодирующий эндонуклеазу Cas9, последовательность из 20 нуклеотидов, которая кодирует направляющую sgRNA к консервативному домену гена *Y1ACL2*, а также маркер устойчивости к гигромицину (*hph*). Последовательность ДНК-мишени из 20 п.н. была выбрана с помощью программы CHOPCHOP (Labun *et al.*, 2016). Штамм *Y. lipolytica* W29 трансформировали pCRISPR-hphsgY1ACL2 и отбирали трансформантов по устойчивости к

гигромицину. Среди 24 отобранных трансформантов 18 (75%) потеряли способность расти на минимальной среде YNBCitr (рисунок 7). Инактивацию *YIACL2* подтвердили для трех трансформантов с помощью секвенирования консервативного домена гена *YIACL2* (рисунок 8). Таким образом, на модели гена *YIACL2* было показано, что инактивация с помощью CRISPR-Cas9 системы была 19 раз более эффективна по сравнению с традиционным методом.

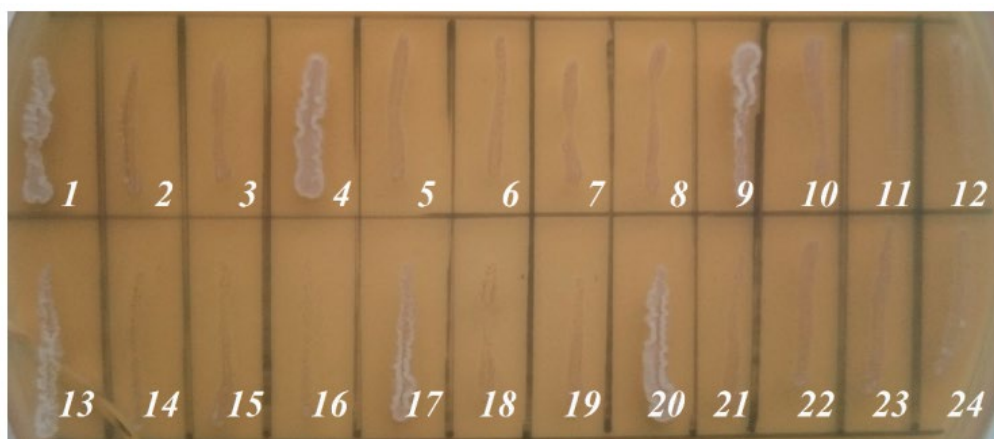


Рисунок 7. Фенотип трансформантов (1–24), отобранных в результате трансформации штамма *Y. lipolytica* W29(Ura-) плазмидой pCRISPR-hph-sgYIACL2, на агаризованной среде YNBCitr, содержащей цитрат в качестве единственного источника углерода (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

<i>YIACL2</i> wild type	TACGCCAAAACCGTACTGGATCTCATGACCCGGGGCGACGCTCACCCCGAGGGC
delta <i>YIACL2</i> clon 2	TACGCCAAAACCGTACTGGATCTCATGACC- GGGGCGACGCTCACCCCGAGGGC
delta <i>YIACL2</i> clon 3	TACGCCAAAACCGTACTGGATCTCATGACC- GGGGCGACGCTCACCCCGAGGGC
delta <i>YIACL2</i> clon 5	TACGCCAAAACCGTACTGGATCT----- GGGGCGACGCTCACCCCGAGGGC

Рисунок 8. Результаты секвенирования консервативного домена гена *YIACL2* трансформантов № 2, 3 и 5, проведенного для подтверждения инактивации гена. Серым выделена последовательность 20 п.н. ДНК-мишени, подчеркиванием выделен смежный мотив протоспейсера (PAM) (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

Здесь и далее вспомогательные плазмиды pCasNA-Int несут ген *Cas9* *Streptococcus pyogenes*, содержащий на С-конце сигнал ядерной локализации NLS вируса SV40, под контролем сильного гибридного промотора UAS1B8-TEF₍₁₃₆₎; промотор полимеразы III типа SCR1, слитый с тРНК_{Gly} для экспрессии одноцепочечного РНК-гида (sgРНК); структурную часть sgРНК длиной 20 п.н., гомологичную локусам интеграции (Int); маркер устойчивости к нурсеотрицину (Nat). Набор вспомогательных плазмид pCasNA-Int, содержащих последовательность sgRNA, направляющих Cas9 к заданному участку на хромосоме получали методом рекомбинации вспомогательной плазмиды pCasNA-RK с олигонуклеотидом как показано на рисунке (рисунок

9) (Yuzbashev *et al.*, 2022). Рекомбинация происходила в штамме EcoRed. Рекомбинантные колонии отбирали по устойчивости к стрептомицину и чувствительности к канамицину.

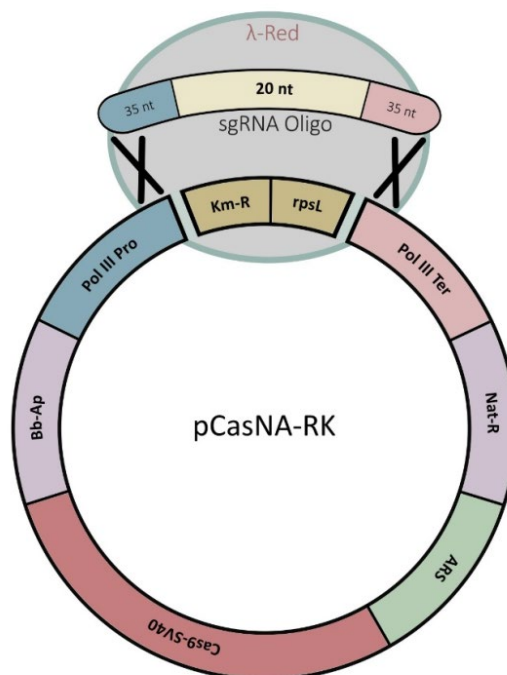


Рисунок 9. Схема получения вспомогательной плазмиды для интеграции с помощью CRISPR-Cas9 (Yuzbashev *et al.*, 2022). Показано встраивание последовательности sgRNA путем рекомбинации последовательности плазмиды pCasNA-RK и одноцепочечного олигонуклеотида. Олигонуклеотид имеет длину 90 нуклеотидов, 20 из которых комплементарны сайту интеграции в геноме *Y. lipolytica*. Сокращения: Cas9-SV40 - ген *Cas9* с NLS SV40; Km-R - ген устойчивости к канамицину; Nat-R - ген устойчивости к ноурсеотрицину; Pol III Pro - гибридный промотор SCR1'- tRNAGly РНК-полимеразы III; Pol III Ter – последовательность терминатора РНК-полимеразы III.

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 (HR) 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, контролирующего гомологичную рекомбинацию (Ji *et al.*, 2020).

Оценка эффективности использования двух вышеописанных стратегий была проведена на примере опосредованной CRISPR-Cas9 инактивации генов *DGK1* и *PAH1*, кодирующих

диацилглицеролкиназу и фосфатидатфосфатазу, соответственно. В обоих случаях клетки трансформировали двумя различными вспомогательными плазмидами, каждая из которых несла последовательность sgRNA, комплиментарную области внутри целевого гена как показано на рисунке 10. 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 (приложение, рисунок S1). Эффективность получения делеции *DGK1* и *PAH1* в штаммах W29, W29 $\Delta ku70$ и W29 *RAD52* приведена в таблице 6.

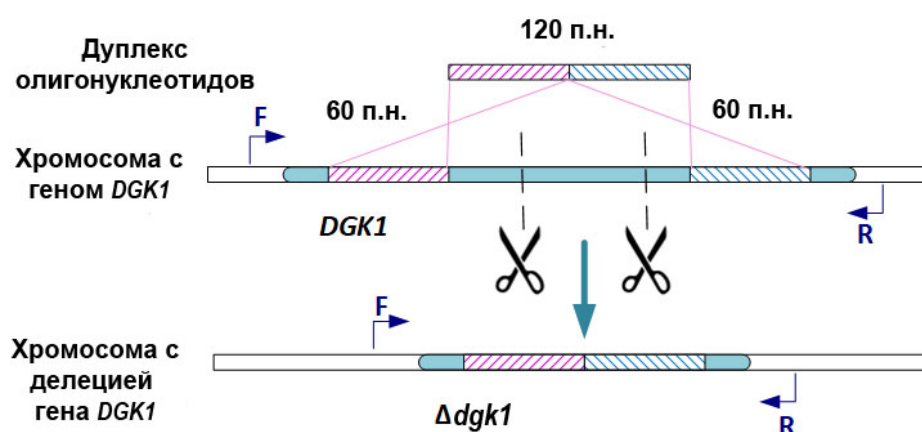


Рисунок 10. Схема инактивации гена *DGK1* путем внесения двуцепочечного разрыва (места разрывов показаны пунктиром с ножницами), опосредованного CRISPR-Cas9 и интеграции фрагмента ДНК длиной 120 п.н., состоящего из последовательностей, гомологичных областям, расположенным выше и ниже *DGK1*. Сайты отжига проверочных праймеров обозначены буквами F и R.

По приведённым в литературе данным, в штамме *Y. lipolytica* Po1d делецию гена *ADE2*, кодирующего аденозинсукцинатсинтазу, не удалось получить в экспериментах, в которых в качестве матрицы для репарации использовали фрагменты ДНК, несущие маркер *URA3* и фланкированные областями гомологии выше и ниже разрыва длиной менее 250 п.н. (Verbeke *et al.*, 2013). При увеличении областей гомологии до 500 п.н. делеция *ADE2* проходила лишь в 2% случаев. Эффективность внесения делеции *ADE2* в штамме Po1d $\Delta ku70$ также повышалась при увеличении длины областей гомологии. Так, для последовательностей длиной 100 п.н. эффективность внесения делеции достигала 33%, а при увеличении длины до 250 п.н. - 40%. В нашей работе, как и ожидалось, ни в одном из проверенных трансформантов штамма W29 не было получено делеций генов *DGK1* и *PAH1* в отличие от модифицированных штаммов (таблица 6). 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 $\Delta ku70$.

Таблица 6. Эффективность (доля правильных рекомбинантов среди протестированных устойчивых к ноурсеотрицину трансформантов) инактивации генов *DGKI* и *PAH1* с помощью CRISPR-Cas9.

Ген	Штамм		
	W29	W29 $\Delta ku70$	W29 <i>RAD52</i>
<i>DGKI</i>	0 %	100 %	67 %
<i>PAH1</i>	0 %	50 %	17 %

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

Далее разработку системы редактирования генома дрожжей *Y. lipolytica* на основе CRISPR-Cas9 проводили в процессе конструирования штаммов-продуцентов терпеноидов. Исходя из анализа литературы, создание стабильных производственных штаммов часто требует повышения уровня экспрессии значительного числа генов (таблица 1). Интеграция экспрессионных кассет традиционным методом подразумевает их встраивание совместно с селективным маркером. Перед последующим раундом интеграции маркер удаляют с помощью сайт-специфической рекомбиназы Cre. Исходя из опыта научной группы, в которой была выполнена настоящая работа (Yuzbashev *et al.*, 2022), для встраивания одной генетической конструкции традиционным методом необходимо затратить 21 день. Таким образом, последовательное встраивание 10 экспрессионных кассет займет не менее 210 дней. В то же самое время, для встраивания генетической конструкции с помощью системы CRISPR-Cas9 потребуется только шесть дней, то есть 10 последовательных модификаций займут всего 60 дней.

Используя выбранную стратегию инактивации гена *KU70*, удалось встроить 30 интеграционных кассет размером от 2970 до 8287 п.н. в 17 локусов генома *Y. lipolytica* (таблица 7). В частности, в 70% экспериментов (21 из 30) эффективность интеграции кассет составляла более 80%. Таким образом, разработанная система позволила успешно получать рекомбинантные штаммы, несущие гетерологичные конструкции в целевых геномных локусах.

Таблица 7. Обобщенные данные об эффективности интеграции 30 конструкций, использованных в этой работе, в 17 геномных локусов интеграции.

Локус интеграции	Встраиваемые гены	Участок гомологии IntUp на хромосоме	Участок гомологии IntDn на хромосоме	20 п.н. sgRNA, используемых в Cas9-вспомогательной плазмиде	Эффективность интеграции, %	Соотношение числа правильных клонов к числу проверенных	Размер интегрируемой кассеты, п.н.
IntC13	<i>RAD52</i>	2646315.. 2646874	2647563.. 2648077	AGACATGATGCATATACACA	100	6/6	5081
IntC4	<i>fusCarRP- ERG20^{F88C}</i>	565623.. 566122	566607.. 567106	ACTAACGCAGGATCAAGAGA	100	6/6	4893
IntF14	<i>HMG1</i>	3863884.. 3864383	3865338.. 3865837	ACTGGCAGACAGATAAGACA	100	6/6	4790
IntC4	<i>fusCarRP- GGPPs7</i>	565623.. 566122	566607.. 567106	ACTAACGCAGGATCAAGAGA	100	6/6	4752
IntC4	<i>fusGGPPs7- CarRP</i>	565623.. 566122	566607.. 567106	ACTAACGCAGGATCAAGAGA	100	6/6	4752
IntC14	<i>AaLIS</i>	3133312.. 3133958	3134647.. 3135244	TCTCCATAGGTGTAGAACCA	100	6/6	3819
IntB1	<i>CarB</i>	118362.. 118876	119186.. 119703	CTTCGGCCAACATAAATCTC	100	6/6	3783
IntD3	<i>CarB</i>	784674.. 785187	785776.. 786321	CGAGTAGTGAGACCCATCTG	100	4/4	3783
IntE12	<i>AaLIS</i>	2831926.. 2832470	2832716.. 2833196	ACCCCTATAGCCCAAACCTGT	100	3/3	3600
IntD4	<i>ERG12</i>	1038596.. 1039130	1039406.. 1039926	AGTCGTGGTGGATCCTCAGG	100	3/3	3416
IntC14	<i>HpBKT</i>	3133312.. 3133958	3134647.. 3135244	TCTCCATAGGTGTAGAACCA	100	4/4	3307
IntB11	<i>HpCrtZ</i>	2408220.. 2408818	2409833.. 2410434	AATGTTTGAGAGACAACGAC	100	5/5	3182
IntC13	<i>HpBKT</i>	2646315.. 2646874	2647563.. 2648077	AGACATGATGCATATACACA	100	6/6	3137
IntB1	<i>ERG20^{F88W- N119W}</i>	2408220.. 2408818	2409833.. 2410434	AATGTTTGAGAGACAACGAC	100	6/6	3136
IntC3	<i>CrGPPS</i>	317074.. 317598	317932.. 318444	ACTAACGCAGGATCAAGAGA	100	6/6	2970
IntC2	<i>fusCrGPPS- AaLIS</i>	161071.. 161570	162857.. 163356	TCAAAAAGTCAGTGTGAGGGG	100	6/6	6174
IntE8	<i>fusCarRP- GGPPs7</i>	1739277.. 1739776	1740717.. 1741216	AGGATAGTGCTTGTGTCCAG	83	5/6	4752
IntE8	<i>GFP</i>	1739277.. 1739776	1740717.. 1741216	AGGATAGTGCTTGTGTCCAG	83	5/6	4394
IntE16	<i>AaLIS</i>	3975493.. 3976035	3976233.. 3976833	TACTACTTGTAGTAGGACCA	83	5/6	3718
IntC2	<i>fusAaLIS- CrGPPS</i>	161071.. 161570	162857.. 163356	TCAAAAAGTCAGTGTGAGGGG	80	4/5	6174
IntE8	<i>CarB-CarRP- GGSI</i>	1739277.. 1739776	1740717.. 1741216	AGGATAGTGCTTGTGTCCAG	80	8/10	8287
IntE12	<i>HpCrtZ</i>	2831926.. 2832470	2832716.. 2833196	ACCCCTATAGCCCAAACCTGT	50	3/6	3007
IntA2	<i>ERG20^{F88W- N119W}</i>	221472.. 221980	222348.. 222858	AACAGCAACATCTTACATCC	40	2/5	3065
IntA2	<i>ERG20</i>	221472.. 221980	222348.. 222858	AACAGCAACATCTTACATCC	40	2/5	3065
IntE6	<i>fusHpBKT- HpCrtZ</i>	895599.. 896101	896482.. 896990	TACGAGTAGAGACGTAACG	33	2/6	3844
IntE6	<i>fusHpCrtZ- HpBKT</i>	895599.. 896101	896482.. 896990	TACGAGTAGAGACGTAACG	33	2/6	3844
IntE6	<i>HpCrtZ</i>	895599.. 896101	896482.. 896990	TACGAGTAGAGACGTAACG	33	2/6	2992

IntA4	<i>fusCarRP- ERG20^{F88C}</i>	929717.. 930217	930555.. 931055	ACTATGATGAACTCACGTTG	17	1/6	4893
IntF11	<i>fusHpCrtZ- HpBKT</i>	3458258.. 3458790	3459091.. 3459592	AGTGGTATGGCTCTTCACAC	17	1/6	3844
IntF11	<i>HpBKT</i>	3458258.. 3458790	3459091.. 3459592	AGTGGTATGGCTCTTCACAC	17	1/6	3097

3.2. Создание штамма *Y. lipolytica* - платформы для конструирования продуцентов терпенов и терпеноидов

Расширение сырьевой базы для производства веществ терпенового ряда на платформе микроорганизмов является актуальной задачей. В качестве недорогого и доступного источника углерода может быть использована меласса – побочный продукт сахарного производства, содержащий 58–60% остаточных углеводов (главным образом, сахарозу), ежегодный мировой сбор которой достигает 55 миллионов тонн (Zhang *et al.*, 2021b). В данной работе для создания штамма, который будет являться базовой платформой для получения продуцентов соединений терпенового ряда, в геном *Y. lipolytica* был интегрирован ген *ScSUC2*, кодирующий инвертазу *S. cerevisiae* в сочетании с сверхэкспрессией нативного гена гексокиназы *HXK1*. Благодаря данной модификации штамм приобрел способность утилизировать сахарозу в качестве единственного источника углерода. Принцип работы данного сочетания генов заключается в том, что фермент инвертаза (*Suc2*) секретируется в культуральную среду, где гидролизует сахарозу до глюкозы и фруктозы, которые поглощают клетки. Внутри клетки гексокиназа катализирует реакцию, лимитирующую скорость процесса утилизации глюкозы и фруктозы (Lazar *et al.*, 2014; Moeller *et al.*, 2012).

В связи с тем фактом, что большинство терпенов и терпеноидов являются жирорастворимыми, они могут храниться во внутриклеточных гидрофобных компартментах, таких как мембраны или липидные тела (Zhang *et al.*, 2021a). Хорошо известно, что *Y. lipolytica* в большом количестве синтезирует и накапливают липиды. Более того, внутриклеточное содержание липидов может быть дополнительно увеличено посредством метаболической инженерии, что может быть использовано для создания штаммов-продуцентов терпенов и терпеноидов. Так, ранее было показано, что штаммы *Y. lipolytica* с повышенным накоплением липидов более эффективно продуцируют β-каротин и ликопин (Larroude *et al.*, 2018; Matthaus *et al.*, 2014). В частности, Larroude с соавторами на основе штамма с повышенной продукцией липидов (характеризующемся сверхэкспрессией генов *DGA2* и *GPD1*, а также делециями Δ *proX1-6* Δ *tg14*) получили штамм-продуцент каротиноидов, который накапливал в 1,93 раза больше β-каротина, чем контрольный штамм без повышенной продукции липидов.

В пути биосинтеза терпенов по мевалонатному пути реакция образования мевалоната, лимитирующая скорость процесса (Ashour *et al.*, 2010), потребляет НАДФН. Известно, что активация биосинтеза кофермента НАДФН может быть достигнута с помощью сверхэкспрессии гена *ZWF1*, кодирующего глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Yuzbasheva *et al.*, 2017). Также важно отметить, что у *Y. lipolytica* пентозофосфатный путь является основным источником НАДФН для биосинтеза липидов.

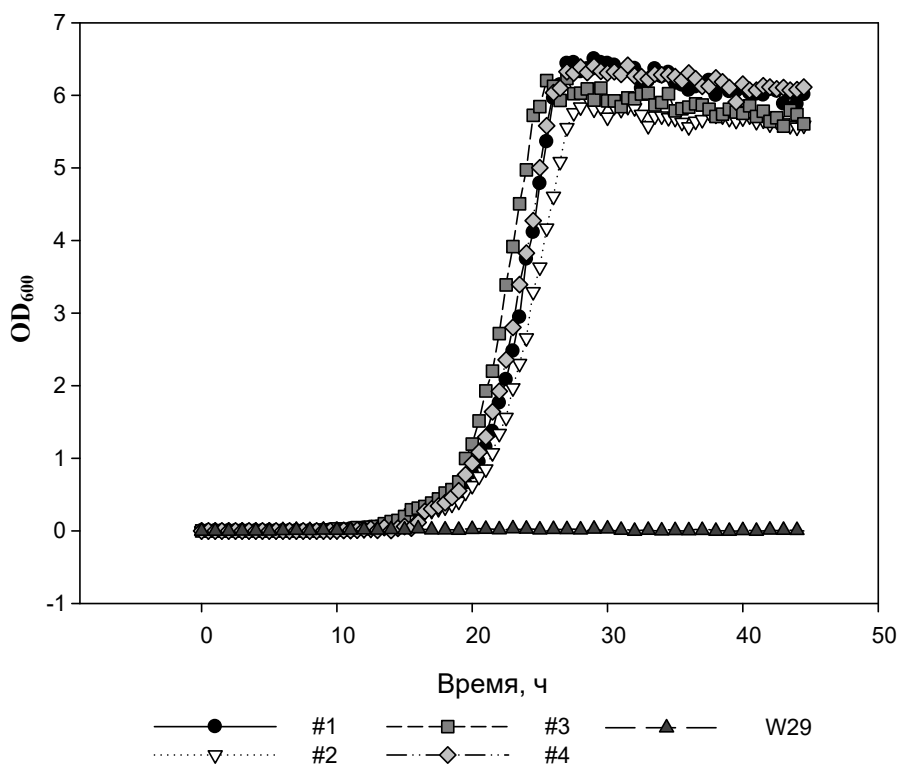


Рисунок 11. Кривые роста трансформантов W29 (*ScSUC2 HXK1*) #1, #2 и W29 (*Δpex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1*) #3, #4 и контрольного дикого штамма W29 при культивировании в минимальной среде YNB, содержащей 8 г/л сахарозы в качестве единственного источника углерода (Taratynova *et al.*, 2021).

Исходя из этих рассуждений, нами были получены штаммы с генотипом W29 (*ScSUC2 HXK1*) и W29 (*Δpex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1*) как описано в (Taratynova *et al.*, 2021). Сверхэкспрессия нативных генов *ACBP*, *ACC1* и *DGA1*, кодирующих ацил-КоА-связывающий белок, ацетил-КоА-карбоксилазу и диацилглицерин-О-ацилтрансферазу, соответственно, а также делеция гена *PEX10*, участвующего в биогенезе пероксисомы, где происходит деградация липидов, были осуществлены в целях получения штамма с высоким накоплением липидов. Для двух клонов каждого из данных штаммов был проведен анализ роста на минимальной среде с низким (8 г/л) и высоким (100 г/л) содержанием сахарозы (рисунок 11,

таблица 8). Из приведенных результатов следует, что сверхэкспрессия *ScSUC2* и *HXK1* придает клеткам *Y. lipolytica* способность потреблять сахарозу (таблица 8).

Таблица 8. Удельная скорость роста (μ) и время удвоения клеток (t) рекомбинантных штаммов при росте на сахарозе в качестве единственного источника углерода (Taratynova *et al.*, 2021).

Штамм	Сахароза 8 г/л		Сахароза 100 г/л*	
	μ	t	μ	t
W29 (<i>ScSUC2 HXK1</i>) #1	0,31	2,25	0,29	2,40
W29 (<i>ScSUC2 HXK1</i>) #2	0,26	2,67	0,28	2,50
W29 (Δ <i>pex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1</i>) #3	0,29	2,35	0,27	2,52
W29 (Δ <i>pex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1</i>) #4	0,31	2,25	0,29	2,37

* - кинетику роста анализировали в экспоненциальной фазе роста в период с 23 по 29 час культивирования.

Таблица 9. Накопление биомассы и нейтральных липидов рекомбинантными штаммами при культивировании в минимальной среде с сахарозой в качестве единственного источника углерода. Контрольные штаммы W29 и W29 (Δ *pex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1*) культивировали в таких же условиях, но с глюкозой в качестве источника углерода (Taratynova *et al.*, 2021).

Штамм	Биомасса, г сух веса/л	Общее содержание липидов % сух веса	Состав жирных кислот %				
			C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
W29 (<i>ScSUC2 HXK1</i>) #1	13	21,5	21,0	7,6	11,1	44,3	13,8
W29 (<i>ScSUC2 HXK1</i>) #2	14,5	20,8	20,7	7,7	9,6	46,1	13,7
W29 (Δ <i>pex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1</i>) #3	22	50,7	34,6	4,3	17,6	37,6	4,9
W29 (Δ <i>pex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1</i>) #4	20	47,6	33,5	3,7	18,4	39,1	4,3
W29 (Δ <i>pex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1</i>)	17,8	44,7	30,6	7,2	13,4	36,9	10,3
W29	13	19,3	20,1	9,2	7,3	47,7	13,6

Полученные штаммы также были охарактеризованы с точки зрения накопления нейтральных липидов. При культивировании штаммов в условиях голодания по азоту на среде с сахарозой в качестве единственного источника углерода все штаммы были способны накапливать внутриклеточные нейтральные липиды на уровне, сравнимом, и даже в ряде случаев более высоком, чем в аналогичной среде с глюкозой (таблица 9). Лучший результат показал штамм W29 (Δ *pex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1*) #3, который накапливал нейтральные липиды в количестве 50,7 % от сухого веса клеток, что на 13 % превышает

накопление нейтральных липидов родительским штаммом W29 (*Δpex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGAI*) и в 2,6 раза выше по данному показателю по сравнению с W29. В связи с этим, дальнейшее конструирование штаммов продуцентов терпеноидов было продолжено на основе штамма W29 (*Δpex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGAI ScSUC2 HXK1*) #3. В результате последующей инактивации гена *KU70* как описано в (Taratynova *et al.*, 2021), был получен базовый штамм ВКПМ Y-4620 для конструирования продуцентов терпеноидов в данной работе (таблица 2).

3.3. Создание штамма *Y. lipolytica*, синтезирующего монотерпен линалоол

Ранее на *Y. lipolytica* было продемонстрировано, что сверхэкспрессии гена *HMG1*, кодирующего 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу, приводит к увеличению накопления линалоола в 4,7 раз (Cao *et al.*, 2017). Сочитание сверхэкспрессии гена *HMG1* с сверхэкспрессией гена *ERG12*, кодирующего мевалонаткиназу, приводило к увеличению продукции линалоола в 7,6 раз (рисунок 12). Универсальные предшественники как MVA-, так и MEP-пути биосинтеза терпеноидов, изопропилпирофосфат (IPP) и диметилаллилпирофосфат (DMAPP), могут конденсироваться с образованием геранилдифосфата (GPP) под действием геранилдифосфатсинтазы (Li *et al.*, 2021c). Затем GPP может быть преобразован в линалоол. Однако, у дрожжей *Y. lipolytica* активность как геранилдифосфатсинтазы, так и фарнезилдифосфатсинтазы принадлежат одному белку, называемому фарнезилдифосфатсинтазой (*erg20*). Под действием фарнезилдифосфатсинтазы GPP преобразуется в фарнезилдифосфат (FPP), что снижает накопление GPP в клетках (Fischer *et al.*, 2011). Важно отметить, что продукт ферментативной активности гена *ERG20*, FPP, жизненно важен для клетки *Y. lipolytica*, так как является предшественником нескольких классов ключевых метаболитов, таких как эргостерол, долихолы, убихинон, гем А, пренилированные белки. В связи с этим используют мутантный аллель *ERG20^{F88W-N119W}*, экспрессия которого приводит к образованию преимущественно GPP (Ignea *et al.*, 2014). Последующее введение линалоолсинтазы (LIS) позволяет получить штамм, накапливающий линалоол (таблица 2).

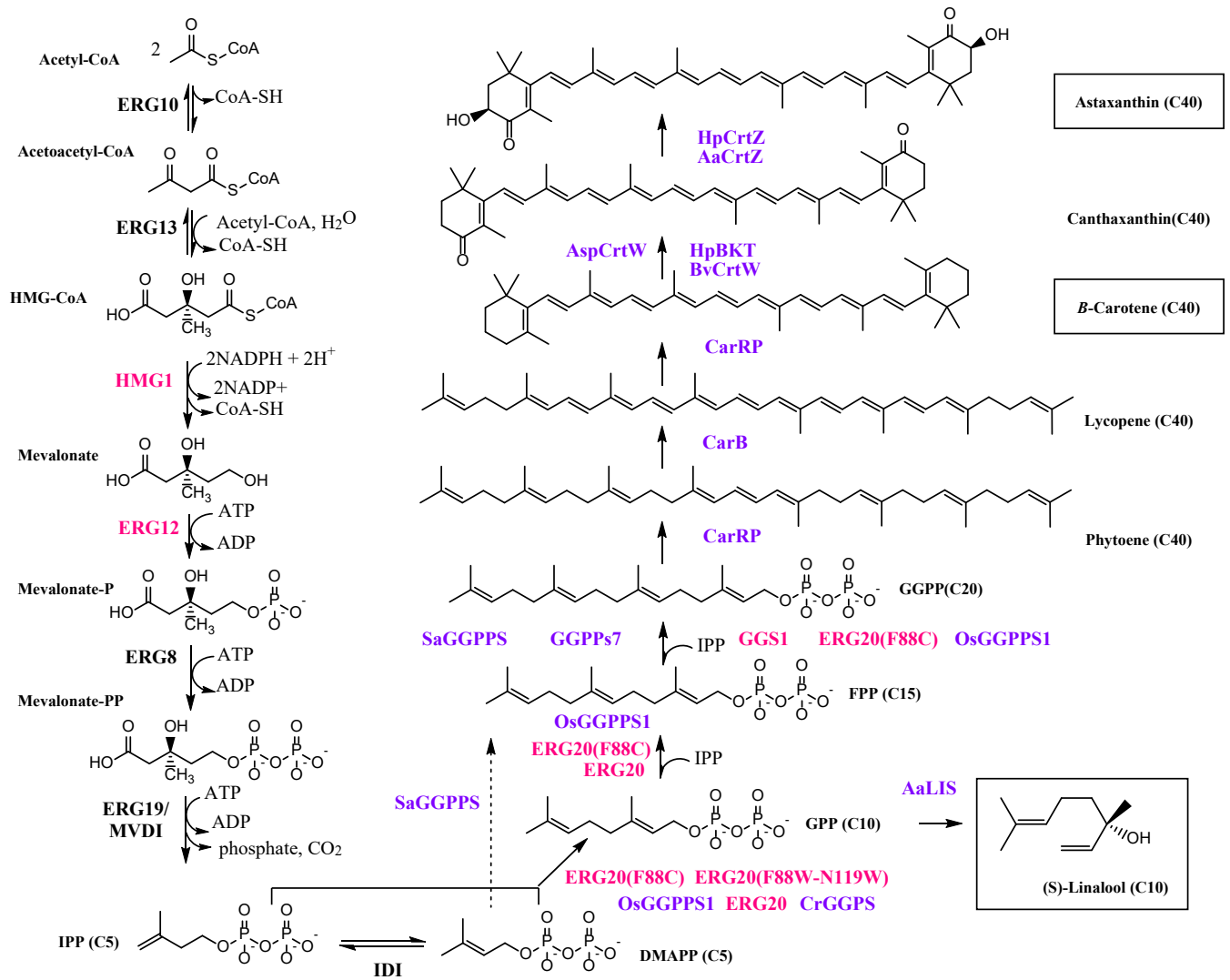


Рисунок 12. Схема мевалонатного пути синтеза веществ терпенового ряда. Нативные гены *Y. lipolytica*, сверхэкспрессия которых по литературным данным положительно сказывается на продукции терпеноидов, выделены розовым, гетерологичные гены, интеграция которых упомянута в последующих разделах работы, выделены фиолетовым цветом. На схеме представлены гены, кодирующие ферменты: линалоолсинтазу (*AaLIS Actinidia argute*); фитоендегидрогеназу (*CarB Mucor circinelloides*); бифункциональный фермент фитоенсинтазу и ликопин-β-циклазу (*CarRP M. circinelloides*); геранилдифосфатсинтазу *CrGGPS Catharanthus roseus*; геранилгеранилдифосфатсинтазу (*GGPPs7 Synechococcus sp.*, *GGS1 Y. lipolytica*, *OsGGPPS1 Oryzae sativa*, *SaGGPPS S. acidocaldarius*); фарнезилдифосфатсинтазу (*ERG20 Y. lipolytica* и два мутантных аллеля *ERG20^{F88C}*, *ERG20^{F88W-N119W}*); β-каротингидроксилазу (*HpCrtZ H. pluvialis*, *AacrtZ Agrobacterium aurantiacum*); β-каротинкетолазу (*HpBKT H. pluvialis*, *BvcrtW Brevundimonas vesicularis* и *AspcrtW Alcaligenes sp.*).

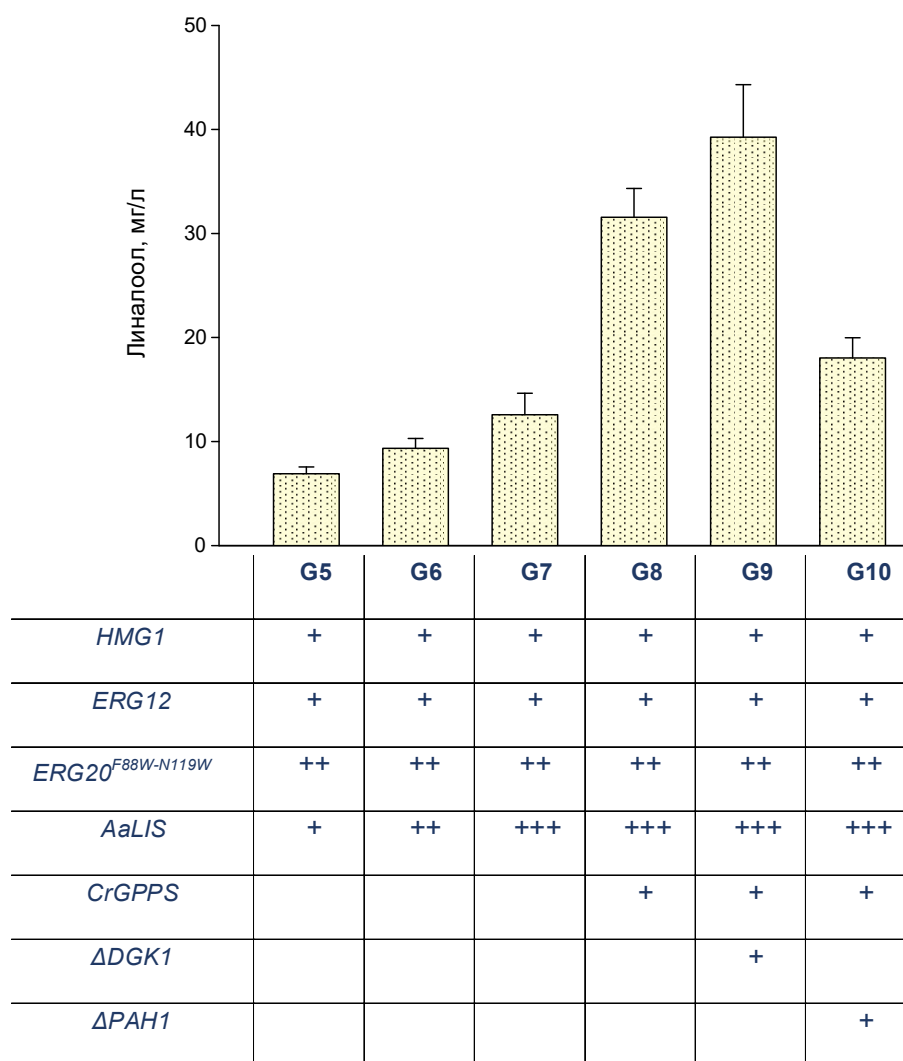


Рисунок 13. Продукция линалоола сконструированными штаммами *Y. lipolytica* при двухфазном культивировании в колбах. Клетки культивировали в богатой среде YP с сахарозой (90 г/л) в качестве источника углерода в течение 5 дней, на 3-и сутки был добавлен изопропилмиририлат (IPM). Планки погрешностей указывают на стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов (Taratynova *et al.*, 2023). В таблице под диаграммой число знаков «+» обозначает число копий конструкции, приведенной в крайнем левом столбце.

В работе по конструированию продуцента линалоола в качестве родительского использовали штамм ВКПМ Y-4620 с генотипом W29 (*Δpex10 Δku70::Cas9 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1*). В нем были последовательно сверхэкспрессированы гены *HMG1*, *ERG12* и две копии гена *ERG20^{F88W-N119W}*. 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 (рисунок 13, приложение рисунок S2). 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* (Met₁₀₀-CrGPPS), кодирующий геранилдифосфатсинтазу, в результате чего был получен штамм G8 (таблица 2). CrGPPS представляет собой гомомерный фермент с двумя высококонсервативными областями, богатыми аспартатом и важными для каталитической функции и связывания субстрата (Rai *et al.*, 2013). Анализ *in vitro* показал, что основной реакцией, катализируемой этим ферментом, является конденсация IPP и DMAPP с образованием GPP, тогда как GGPP образуется лишь в следовых количествах (Rai *et al.*, 2013). Действительно, штамм G8, экспрессирующий *CrGPPS*, демонстрировал 2,5-кратное увеличение титра линалоола (31,6 мг/л) по сравнению с родительским штаммом G7 (рисунок 13) (RU2809554C1).

Ранее было показано, что инактивация гена *PAH1*, кодирующего фосфатазу фосфатидной кислоты приводит к расширению эндоплазматического ретикулума, что стимулирует экспрессию рекомбинантных ферментов биосинтеза тритерпенов и, в конечном счете, увеличивает их накопление (Arendt *et al.*, 2017). Также было отмечено, что клетки, лишённые *PAH1*, имеют дефект целостности клеточной стенки (Park *et al.*, 2015), что может увеличивать ее проницаемость и снижать содержание токсичного линалоола в клетках. Диацилглицеролкиназа (*DGK1*) участвует в процессе биосинтеза фосфатидной кислоты и регуляции биосинтеза изопентенилдифосфата, мевалонатного пути. Описано, что совместная инактивация генов *DGK1* и *PAH1* увеличивала выход терпеноида люпиола (Zhang *et al.*, 2020b). Поэтому в штамме G8 был инактивирован ген *PAH1* (с получением штамма G10), что привело к снижению роста (с 16,7(G8) до 9,1 г сухого веса/л (G10)), а также уменьшению титра линалоола в 1,8 раза (18,0 мг/л) (рисунок 13). Напротив, инактивация гена *DGK1* в штамме G8 (с получением штамма G9) повысила продукцию линалоола в 1,2 раза (39,3 мг/л) по сравнению с родительским штаммом (рисунок 13). Инактивация двух генов *DGK1* и *PAH1* в штамме G8 привела к значительному нарушению роста клеток, в связи с чем было принято решение исключить данный штамм из дальнейшей работы.

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 (рисунок 14). 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 C-концевой участок с *CrGPPS*; *fusAaLIS-CrGPPS*) продемонстрировали повышение продукции линалоола по сравнению с родительским штаммом G9 (рисунок 14). Штамм G12, показавший наилучшие результаты, накапливал 60,9 мг/л линалоола в колбах на 5 сутки культивирования.

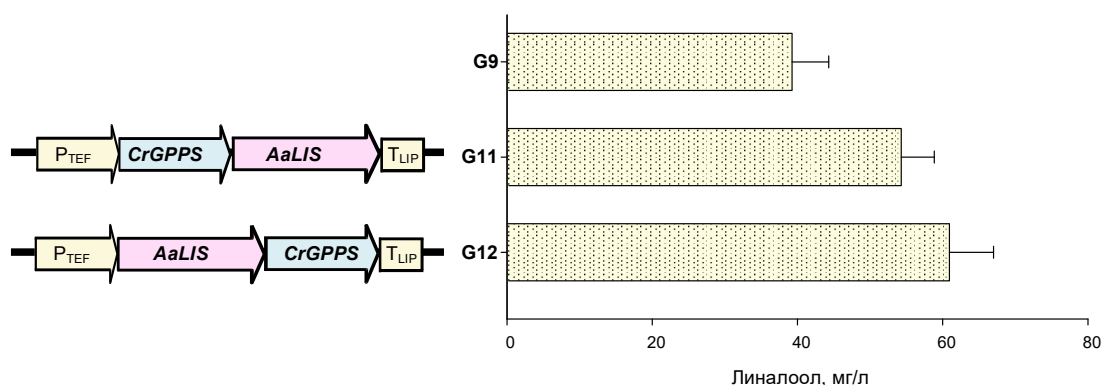


Рисунок 14. Схема конструкций, содержащих гены *AaLIS* и *CrGPPS*, слитые между собой через последовательность, кодирующую гибкий линкер Gly-Gly-Gly-Ser (слева). Продукция линалоола сконструированными штаммами *Y. lipolytica* при двухфазном культивировании в колбах (справа). Клетки культивировали в богатой среде с сахарозой (90 г/л) в качестве источника углерода в течение 5 дней, на 3-е сутки был добавлен ИРМ. Показаны средние значения трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение (Taratynova *et al.*, 2023).

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 ИРМ на третий день. Биомасса (г сухого веса/л) росла на протяжении всего культивирования (рисунок 15). Накопление линалоола оценивали, начиная с 72-ого часа культивирования. На 7 день содержание линалоола достигло 109,6 мг/л.

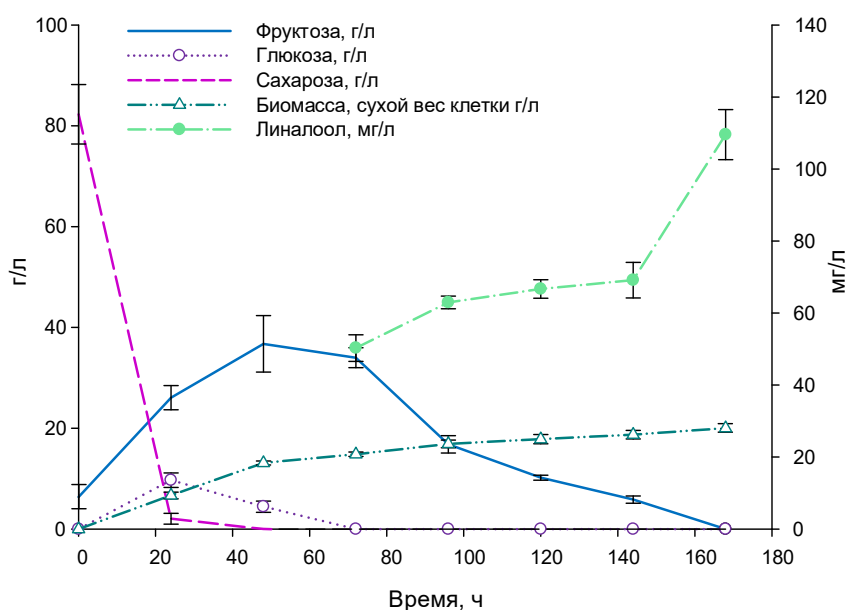


Рисунок 15. Результаты культивирования штамма G12 в колбах. Концентрации линалоола (светло-зеленая штрихпунктирная линия), биомассы (зеленая штрихпунктирная линия с двумя точками), сахарозы (розовая пунктирная линия), глюкозы (фиолетовая точечная пунктирная линия с кружками) и фруктозы (синяя линия) (Taratynova *et al.*, 2023). Показано среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

При культивировании в выше описанных условиях было оценено потребление сахарозы. Штамм G12 (как и все потомки штамма ВКПМ Y-4620) способен утилизировать сахарозу в качестве единственного источника углерода благодаря сверхэкспрессии генов *ScSUC2* *S. cerevisiae* и *HXK1* *Y. lipolytica* (Taratynova *et al.*, 2023). Инвертаза (Suc2) секретируется в культуральную среду, где катализирует гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Затем происходит поглощение полученных моносахаридов клетками и дальнейший катаболизм (Mohandesi *et al.*, 2016). Показано, что гексокиназа дрожжей *Y. lipolytica*, участвующая в гликолизе, имеет высокое сродство к фруктозе (Lazar *et al.*, 2014). На штамме W29 с сверхэкспрессированным нативным геном *HXK1* также показано, что гексокиназная активность лимитирует рост на фруктозе и значительно не влияет на рост на глюкозе. Однако, в данном исследовании, не смотря на сверхэкспрессию нативной *HXK1*, при одновременном росте на глюкозе и фруктозе происходила задержка в поглощении фруктозы. В проведенном культивировании сахароза полностью гидролизовалась к 48 ч (приложение рисунок S3 А, Б). Концентрация глюкозы на 24-ый час составила 9,7 г/л и полностью была израсходована на 72-ой час. Однако, содержание фруктозы сохранялось на уровне 16,8 – 36,7 г/л в течение 72 часов. Полностью фруктоза была потреблена лишь к 168 часу. Те же закономерности в потреблении сахарозы с заметной задержкой поглощения фруктозы наблюдались у контрольных штаммов G2 и G9 (приложение рисунок S4, S5).

3.4. Создание штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica*, синтезирующего β -каротин

Эндогенный путь синтеза веществ терпенового ряда на дрожжах *Y. lipolytica* идет до образования геранилгеранилдифосфата, в связи с чем для получения продукции каротиноидов необходимо внесение гетерологичных генов для дальнейшего его продления. Одновременно с этим для создания штамма продуцента каротиноидов в литературе часто описывают использование сверхэкспрессии генов, кодирующих геранилгеранилдифосфатсинтазы, и оптимизацию мевалонатного пути (Arnesen *et al.*, 2020).

3.4.1. Конструирование штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica* - продуцента β -каротина

В целях конструирования продуцента β -каротина в штамм *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4620 интегрировали гетерологичные гены, кодирующие бифункциональные ферменты фитоенсинтазу/ликопинсинтазу (*CarRP*) и фитоендегидрогеназу (*CarB*) *Mucor circinelloides*, а также ген *GGS1* *Y. lipolytica*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу. Полученный штамм был обозначен как GBK1 и имел генотип W29 ($\Delta pex10 \Delta ku70::Cas9 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1 IntE1::CarRP-CarB-GGS1$) (таблица 2).

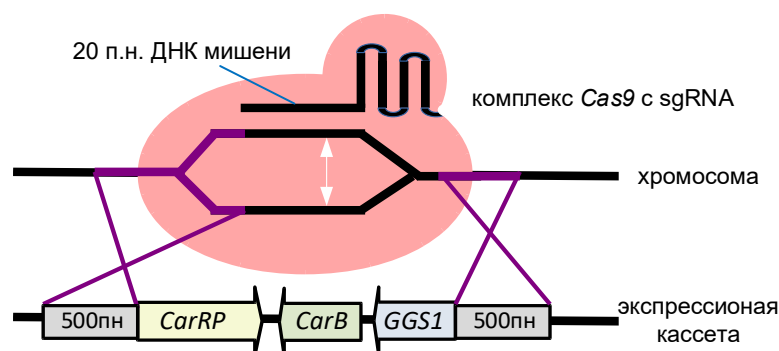
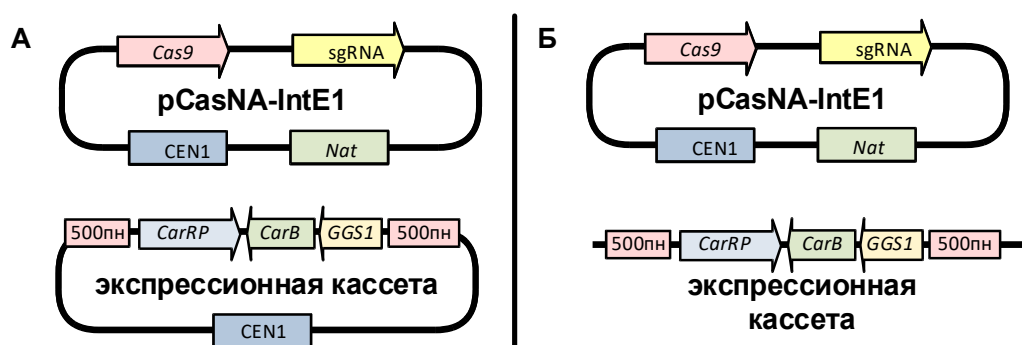


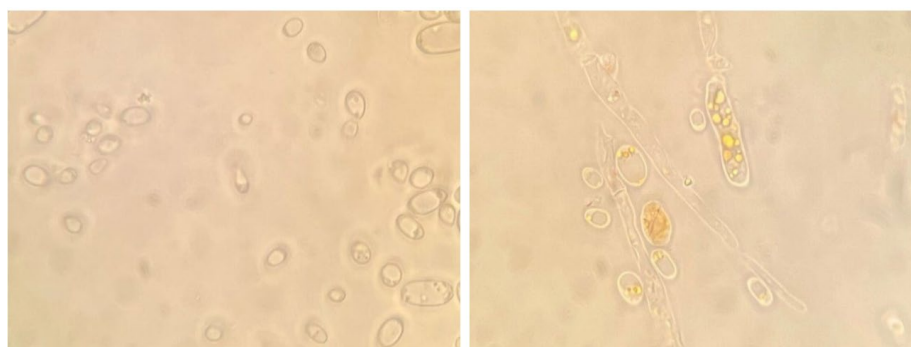
Рисунок 16. Схема интеграции экспрессионной кассеты *CarRP-CarB-GGS1* с фланирующими областями гомологии длиной 500 п.н. к заданному участку на хромосоме в геном *Y. lipolytica* с помощью системы редактирования CRISPR-Cas9. Белой стрелкой показано место внесения двуцепочечного разрыва ДНК эндонуклеазой Cas9, ассоциированной с единой направляющей sgRNA.

В настоящей работе тестировали два набора конструкций для интеграции генов *CarRP*, *CarB* и *GGS1*, состоящие из вспомогательной плазмиды pCasNA-IntE1, содержащей ген Cas9 и последовательность sgRNA, направляющую эндонуклеазу в локус IntE1. Второй компонент

представлял собой кассету *IntE1-CarB-CarRP-GGS1* в виде либо кольцевой плазмиды, либо линейного фрагмента (рисунок 16, 17). В случае использования кольцевой плазмиды совместно с *pCasNA-IntE1* стабильные трансформанты оранжевого цвета не появлялись. Вместе с тем, в результате котрансформации линейного фрагмента с *pCasNA-IntE1* около 80% трансформантов были правильными рекомбинантами и содержали *IntE1-CarB-CarRP-GGS1* в геноме. На основании этих результатов был сделан вывод о том, что для репарации двунитевого разрыва на хромосоме, образованного под действием *Cas9-sgРНК* целесообразно использовать линейный фрагмент, содержащий экспрессионную кассету.



Штамм GBK1, полученный вышеописанным путем, был окрашен в оранжевый цвет. С помощью использования фазово-контрастной микроскопии было наглядно продемонстрировано внутриклеточное накопление β -каротина (рисунок 18).



На штамме GBK1 (Taratynova *et al.*, 2021) была проведена оценка влияния внесения генов геранилгеранилдифосфатсинтаз из разных источников в геном *Y. lipolytica* на продукцию β -каротина. Скрининг был проведен при помощи введения ряда генов в составе автономных плазмид: *GGSI* *Y. lipolytica* (Larroude *et al.*, 2018), *GGPPs7* *Synechococcus* sp. (Tramontin *et al.*, 2019), *OsGGPPS1* *Oryza sativa* (Zhou *et al.*, 2017), *SaGGPPS* *S. acidocaldarius* (Ma *et al.*, 2022) и мутантный аллель *ERG20^{F88C}* *Y. lipolytica*, кодирующий фарнезилдифосфатсинтазу (Arnesen *et al.*, 2020) (рисунок 12) при помощи плазмид pAH-IntA1-P_{TEF_{in}}-*GGSI*-T_{TEF}, pAH-IntA1-P_{TEF_{in}}-*GGPPs7*-T_{TEF}, pAH-IntA1-P_{TEF_{in}}-*OsGGPPS1*-T_{TEF}, pAH-IntA1-P_{TEF_{in}}-*SaGGPPS*-T_{TEF}, pAH-IntA1-P_{TEF_{in}}-*ERG20^{F88C}*-T_{TEF}, соответственно (таблица 3). Ген *OsGGPPS1*, впервые экспрессированный на дрожжах *Y. lipolytica* с целью повышения накопления клетками β -каротина, не повлиял на продукцию. Из рассмотренных генов, наиболее значительно на синтез β -каротина повлияло введение гена *GGPPs7* или *ERG20^{F88C}*, которые повышали титр β -каротина на 20 и 17% соответственно (рисунок 19). Данные гены были отобраны для дальнейшей работы.

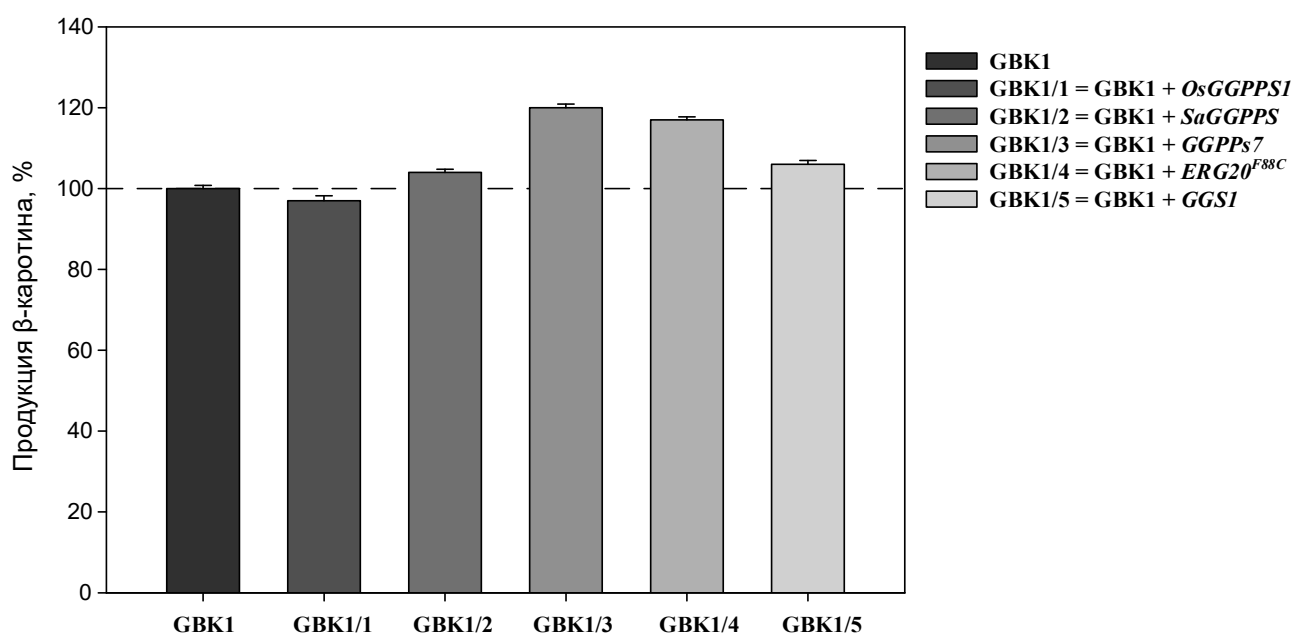
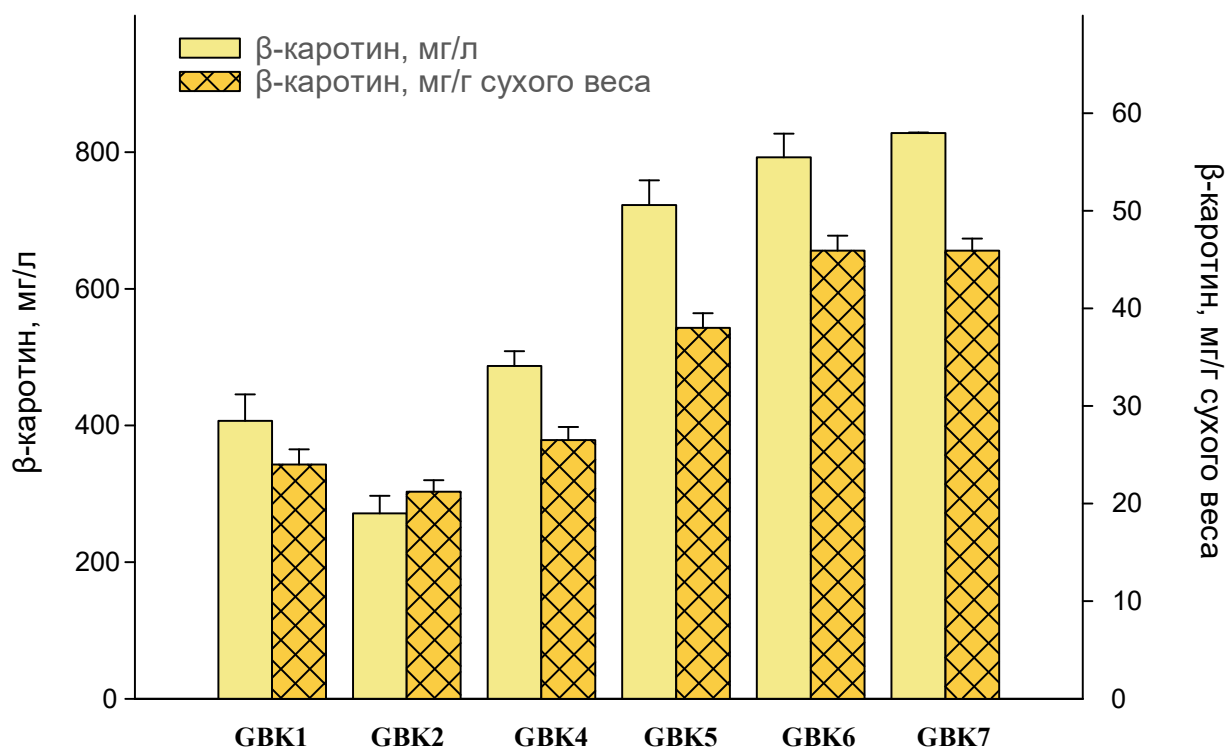


Рисунок 19. Оценка влияния экспрессии геранилгеранилдифосфатсинтаз на продукцию β -каротина относительно родительского штамма GBK1. Показано среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

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) (рисунок 12). Сверхэкспрессия гена *HMG1* приводила к снижению роста клеток, предположительно, из-за накопления

мевалоната до токсичного уровня, но этот эффект ослабевал при сверхэкспрессии генов *ERG12* и *ERG20* (штамм GBK4, таблица 2). В результате 5 дней культивирования полученного штамма GBK4 в пробирке средний титр β -каротина составил 486,9 мг/л (26,5 мг/г сухого веса) (рисунок 20).



<i>CarB CarRP GGS1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>HMG1</i>		+	+	+	+	+
<i>ERG12 ERG20</i>			+	+	+	+
<i>fusCarRP -GGPPs7</i>				+	+	+
<i>fusCarRP -ERG20^{F88C}</i>					+	+
<i>CarB</i>						+

Рисунок 20. Продукция β -каротина сконструированными штаммами *Y. lipolytica*. Клетки культивировали с сахарозой в качестве источника углерода в пробирках в течение 5 дней. Показано среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

В наибольшей степени на накопление β -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) (RU2794980C1). В полученный штамм была введена дополнительная копия гена *CarRP*, слитая через свой С-концевой участок с *ERG20^{F88C}*, кодирующей мутантный аллель *ERG20^{F88C}* *Y. lipolytica*, которая сдвигает активность фермента в сторону образования GGPP (Arnesen *et al.*, 2020) (RU2794980C1). Полученный штамм был назван GBK6. Введение слитых генов *fusCarRP-ERG20^{F88C}* привело к повышению накопления β -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 β -каротина (рисунок 20). Данная модификация оказала влияние на увеличение накопления биомассы штаммом с 17,2 (GBK6) до 18,0 г сухого веса/л (GBK7).

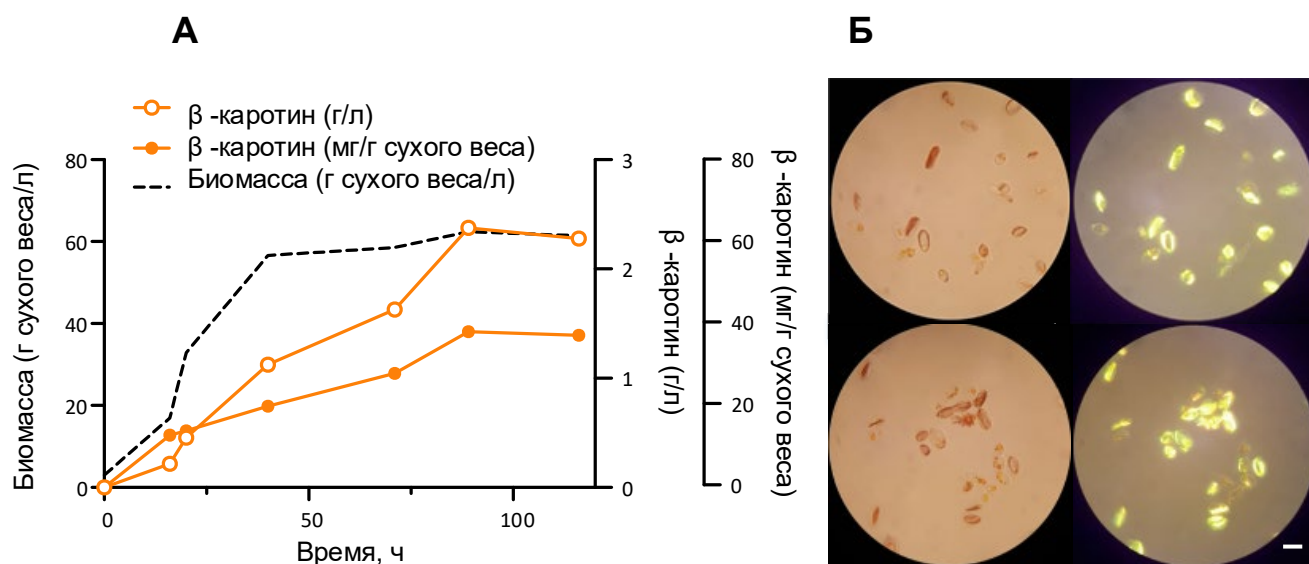


Рисунок 21. Биосинтез β -каротина в ферментере. А - результаты культивирования штамма GBK7 в 3-л биореакторе. Показана динамика изменения титра β -каротина и количества биомассы. Б – Микрофотография клеток штамма GBK7, демонстрирующая образование кристаллов β -каротина, имеющих характерный оранжевый цвет. Результат световой микроскопии культуры показан слева, результат поляризационной микроскопии - справа. Длина масштабной линейки составляет 5 мкм (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Накопление β -каротина штаммом GBK7 (ВКПМ Y-4950) также оценили в 3-л биореакторе, куда непрерывно подавали смесь глюкозы с гидро- и дигидрофосфатом аммония (как описано в материалах и методах) со скоростью 8,5 г/ч при начальной концентрации глюкозы 10 г/л. В описанных условиях продукция β -каротина штаммом GBK7 к 89-му часу культивирования составила 38,0 мг/г сухого веса и 2,4 г/л (рисунок 21А). При этом накопление биомассы составило 62,5 г сухого веса клеток/л. Интересно, что при культивировании в

биореакторе было отмечено внутриклеточное образование кристаллов β -каротина с помощью микроскопии в поляризованном свете (рисунок 21Б). Это первое описание получения кристаллов β -каротина на дрожжах. На данный момент описание образования кристаллов β -каротина присутствует в литературе лишь для клеток растений и такней потребляющих эти растения насекомых (Maass *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2011).

3.4.2. Новый промотор дрожжей *Yarrowia lipolytica* и его применение при конструировании штамма продуцента β -каротина

Y. lipolytica способна утилизировать широкий спектр многоатомных спиртов, в том числе благодаря описанным ранее D-арабитолдегидрогеназам, которые кодируются генами *AraDH1* и *AraDH2* (Wang *et al.*, 2020a). Авторы показали, что в условиях, выбранных для измерения активности *in vitro*, данные ферменты показывают более высокую активность в отношении окисления маннита, арабитола и сорбитола до фруктозы, ксилулозы и сорбозы, соответственно, нежели, наоборот, в отношении восстановления перечисленных сахаров до соответствующих многоатомных спиртов.

До настоящего момента контроль экспрессии гена *AraDH2* при культивировании *Y. lipolytica* на минимальных средах с разными источниками углерода не была предметом исследования. Добавление маннита, сорбитола или арабитола в среду культивирования могло оказать существенное воздействие на экспрессию данного гена. В данной работе в геном штамма дрожжей *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4967 с генотипом W29 ($\Delta pex10 \Delta ku70::URA3 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1$) был интегрирован ген зеленого флуоресцентного белка *hrGFP Renilla* под контролем промотора *pAraDH2* с получением штамма GF1 в целях изучения его активности. Измерение интенсивности флуоресценции выполняли на минимальных средах YNB с использованием различных источников углерода: сахароза (YNBSuc), D-глюкоза (YNBD), а также смеси сахаров: сахарозы и D-фруктозы (YNBSuc/Fru), сахарозы и D-сорбитола (YNBSuc/Sorb), сахарозы и D-маннита (YNBSuc/Man) как показано на рисунках 22 и 23.

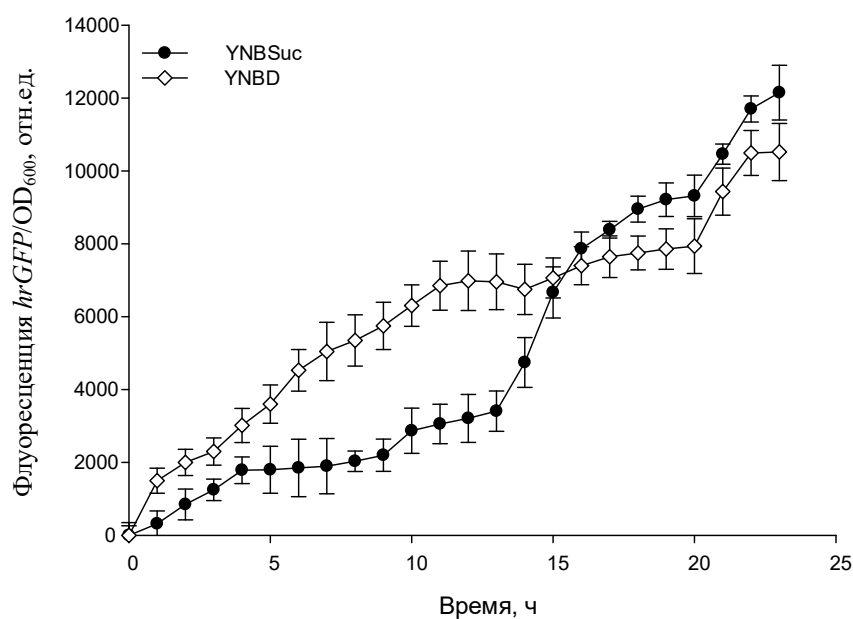


Рисунок 22. Интенсивность флуоресценции клеток штамма GF1, несущего ген *hrGFP* под контролем промотора *rAraDH2*, при росте на минимальных средах с добавлением сахарозы (YNBSuc, черные круги) или D-глюкозы (YNBD, белые ромбы) в качестве единственного источника углерода. Показаны средние значения трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

На средах с глюкозой и сахарозой были отмечены различия в уровне флуоресценции в период с 5 по 14 часов культивирования (рисунок 22). Более высокий уровень флуоресценции на среде с глюкозой в начальные часы культивирования может быть обусловлен особенностями роста культуры на среде с сахарозой.

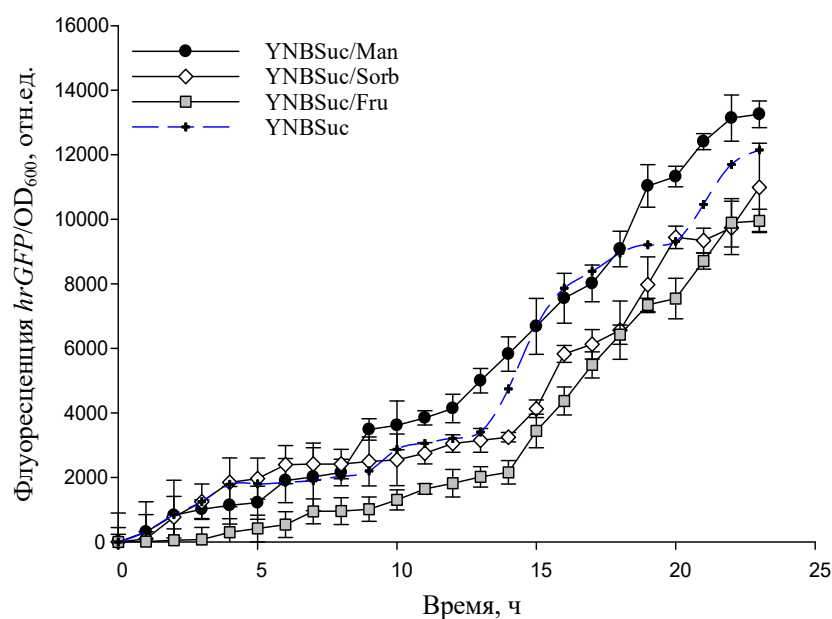


Рисунок 23. Интенсивность флуоресценции биомассы штамма GF1, несущего *hrGFP* под контролем промотора *pAraDH2*, при росте на минимальных средах с сахарозой с добавлением D-маннитола (YNBSuc/Man, черные круги), D-сорбитола (YNBSuc/Sorb белые ромбы) или D-фруктозы (YNBSuc/Fru серые квадраты) в качестве единственного источника углерода. Показаны средние значения трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение. Синей пунктирной линией показаны средние значения интенсивности флуоресценции клеток штамма GF1 в минимальной среде с добавлением сахарозы (YNBSuc).

При внесении D-сорбитола и D-фруктозы в среду с 15 по 23 час культивирования наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции в среднем на 18% и 27%, соответственно, по сравнению с культурой, растущей только на сахарозе (см. рисунок 23). В частности, на 23 часу культивирования зарегистрировано снижение интенсивности флуоресценции клеточной культуры на 10% (на среде YNBSuc/Sorb) и 18% (на среде YNBSuc/Fru) относительно интенсивности флуоресценции, наблюдаемой на среде YNBSuc. В то же время при добавлении D-маннитола было отмечено увеличение флуоресценции на 8% (на 23 час культивирования), а также среднее значение с 15 по 23 час – 8% по сравнению с культурой, растущей только на сахарозе. Таким образом, можно заключить, что, если активность промотора *pAraDH2* и подвержена контролю со стороны маннитола, сорбитола или фруктозы, то лишь в малой степени.

Затем, была продемонстрирована возможность использования промотора *pAraDH2* в задачах метаболической инженерии на примере создания штамма *Y. lipolytica* - продуцента β -каротина. Для этого в штамм ВКПМ Y-4967 с генотипом W29 ($\Delta pex10 \Delta ku70::URA3 ZWF1 ACBP ACC1 DGAI ScSUC2 HXK1$), была интегрирована конструкция, в которой слитые гены *fusCarRP-*

GGPPS7 находилась под контролем промотора *pAraDH2*, а ген *CarB* был помещен под контроль промотора *pTEF* (как показано на рисунке 24). 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 при использовании питательной среды с глюкозой, где уровень накопления β -каротина составил 148,9 мг/л (или 6,3 мг/г сухого веса) β -каротина (таблица 10).

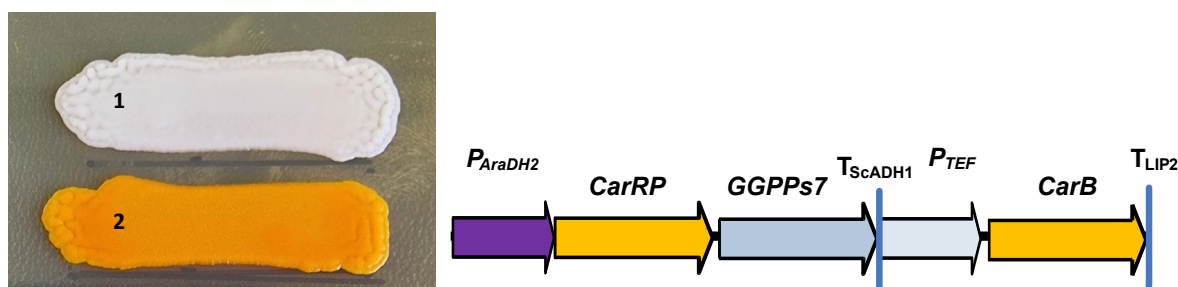


Рисунок 24. Слева: биомасса исходного штамма ВКПМ Y-4967 (1) и штамма-производителя β -каротина ВКПМ Y-5032 (2) на богатой агаризованной среде YPSuc2. Справа: схема конструкции, интегрированной в геном штамма ВКПМ Y-4967 с получением штамма ВКПМ Y-5032. Слитые гены *CarRP-GGPPS7* находятся под контролем промотора *pAraDH2*, ген *CarB* под контролем промотора *pTEF*.

Таблица 10. Накопление β -каротина культурой штамма ВКПМ Y-5032 в богатой среде YP с различными источниками углерода при пятидневном культивировании. Результаты представлены как среднее значение для трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

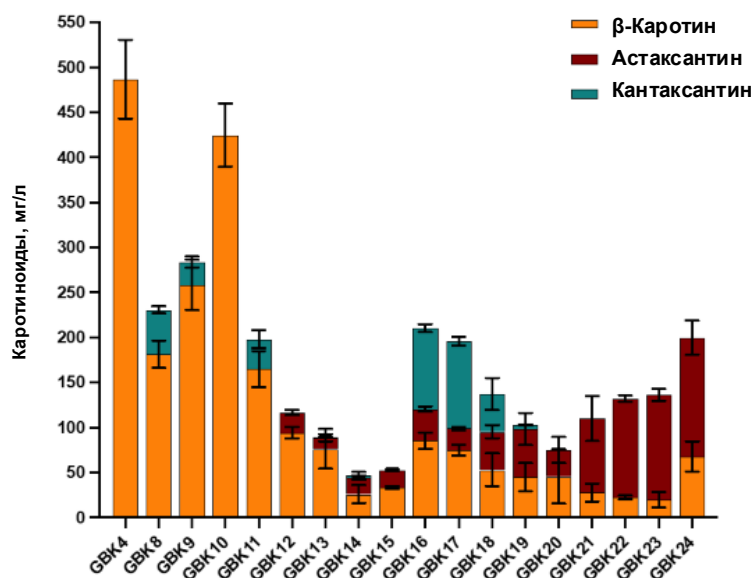
Источник углерода, г/л	Биомасса, г/л	β -каротин, мг/г сухого веса	β -каротин, мг/л
Глицерин, 90	21,5 \pm 0,6	3,1 \pm 0,3	66,3 \pm 7,8
Сахароза, 90	22,7 \pm 0,5	5,3 \pm 0,4	121,2 \pm 6,8
Глюкоза, 90	23,7 \pm 0,1	6,3 \pm 0,6	148,9 \pm 13,9

Следовательно, применение промотора *pAraDH2* для регуляции экспрессии генов *CarRP* и *GGPPS7* позволило создать рекомбинантный штамм, способный накапливать до 148,9 мг/л β -каротина на питательных средах с глюкозой, сахарозой или глицерином. В литературе описаны рекомбинантные штаммы, несущие по одной копии генов *CarRP* и *CarB*, полученные с

использованием промоторов pEXP1 и pGPD1 (Gao *et al.*, 2017), а также pTEF (Larroude *et al.*, 2018), способные продуцировать 4,05 мг/л и 35,7 мг/л β -каротина соответственно.

3.5. Создание штамма *Yarrowia lipolytica* – продуцента астаксантина

Для создания продуцента астаксантина было исследовано влияние различных гетерологичных β -каротинкетолаз (*HpBKT* из *Haematococcus pluvialis*; *BvcrtW* из *B. vesicularis* и *AspcrtW* из *Alcaligenes* sp.) и β -каротингидроксилаз (*HpCrtZ* из *H. pluvialis* и *AacrtZ* из *Agrobacterium aurantiacum*) (Tramontin *et al.*, 2019) (рисунок 12). Наилучшие результаты были получены со штаммом, экспрессирующим сочетание β -каротинкетолазы и β -каротингидроксилазы из *H. pluvialis* (рисунок 25, штамм GBK12). *AspcrtW* *Alcaligenes* sp. и *AacrtZ* *A. aurantiacum* оказались нефункциональны в клетках *Y. lipolytica* (рисунок 25, 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 β -каротина к астаксантину были протестировали варианты слияния генов *HpBKT* и *HpCrtZ* (рисунок 26А). Гибридный фермент, где *HpBKT* был слит через свой С-концевой участок с *HpCrtZ* через линкер Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Pro-Gly-Ser, как было показано (Ma *et al.*, 2021a), позволяет клеткам накапливать больше астаксантина по сравнению с другими вариантами слитых белков. 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 даже штаммы (GBK13 и GBK15), несущие наилучшую слитую конструкцию *fusHpCrtZ-HpBKT* в двух разных геномных локусах (IntE6 и IntF11, соответственно) (рисунок 25). Таким образом, различия между штаммами, содержащими отдельные гены *HpBKT* и *HpCrtZ* и их фьюжн 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 β -каротина и 53,3 мг/л астаксантина, соответственно (рисунок 25).



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^{F88C}</i>																			

Рисунок 25. Накопление β-каротина, кантаксантина и астаксантина сконструированными штаммами *Y. lipolytica* при культивировании в пробирках. Клетки растили на среде YP с сахарозой в качестве источника углерода в пробирках в течение 5 дней. На диаграмме результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение (Yuzbasheva *et al.*, 2022). В таблице под диаграммой число знаков «+» обозначает число копий конструкции, приведенной в крайнем левом столбце.

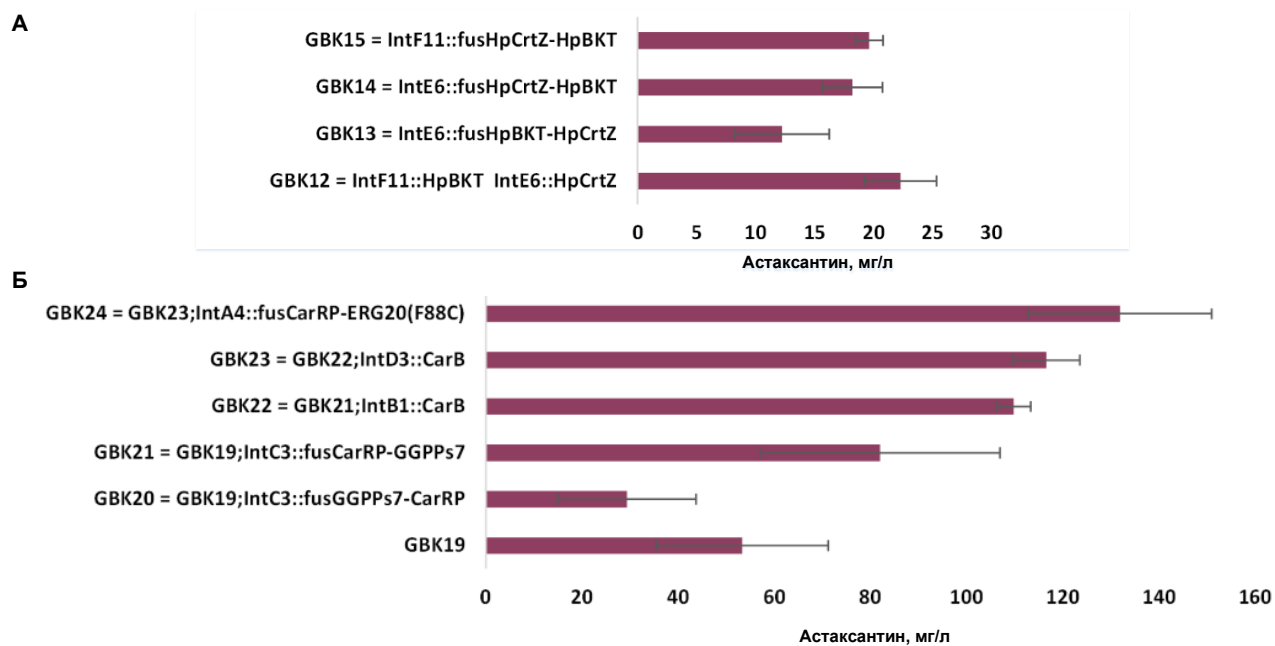


Рисунок 26. Влияние экспрессии слитых генов *HpBKT* и *HpCrtZ* на накопление астаксантина (А). Повышение продукции астаксантина путем экспрессии слитых геранилгеранилдифосфатсинтаз с бифункциональной ликопинциклазой/фитоенсинтазой вместе с дополнительными копиями гена фитоендегидрогеназы (Б). Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

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 (рисунок 25, 26Б) (RU2794980C1). 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, рисунок 26Б). Затем в геном штамма GBK21 были введены еще две копии гена фитоендегидрогеназы *M. circinelloides* (*CarB*), что привело к появлению штамма GBK23 (рисунок 25). Наконец, в геном GBK23 интегрировали слитые гены *fusCarRP-ERG20^{F88C}*. Полученный штамм ВКПМ Y-4871 продуцировал 131,9 мг/л астаксантина в пробирках в богатой среде YP с сахарозой в качестве источника углерода (рисунок 25, 26Б) (RU2794980C1).

Несмотря на то, что слияние генов *CarRP* и *GGPPs7*, участвующих в пути синтеза β-каротина, было эффективной стратегией для повышения конечного титра астаксантина

(возможно, благодаря тому, что из-за близкого расположения двух каталитических центров промежуточный продукт не диффундировал в цитозоль и не участвовал в биосинтезе других метаболитов, таких как эргостерол), слияние β -каротингидроксилазы и β -каротинкетозы не оказало положительного влияния на накопление астаксантина по сравнению с экспрессией каждого фермента по отдельности. Полученный в данной работе результат не согласуется с литературными данными, где было показано, что стратегия слияния этих ферментов улучшает свойства продуцента астаксантина (Ma *et al.*, 2021a). 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.

3.6. Оптимизация условий культивирования штаммов *Yarrowia lipolytica* - продуцентов каротиноидов

Повышение продукции каротиноидов может быть достигнуто не только за счет модификации путей их биосинтеза, но и благодаря оптимизации сред культивирования. В работе было исследовано влияние условий культивирования штамма ВКПМ Y-4871, конструирование которого описано в разделе 3.5, для оптимизации процесса биосинтеза астаксантина в биореакторе с использованием альтернативных источников углерода.

Изначально оптимизация биопродукции астаксантина была проведена в 3-литровых биореакторах с исходным объемом культуры 0,75 л и с использованием глюкозы в качестве источника углерода (приложение рисунок S6). Были протестированы четыре различных режима культивирования, отличающиеся скоростью потока раствора подпитки глюкозы с гидро- и дигидрофосфатом аммония (как описано в материалах и методах) и начальной концентрацией глюкозы (рисунок 27).

Таблица 11. Характеристика процесса во время периодической ферментации штамма ВКПМ У-4871 с подпиткой в 3-литровых биореакторах с различной начальной концентрацией глюкозы и расходом подпитки.

Начальный уровень глюкозы (D_{t0}) и расход подпитки (FR)	Титр астаксантина (мг/л)		Потребление глюкозы (г/л)	Выход астаксантина (мг/г глюкозы)		Скорость синтеза (мг/л/ч)		Удельный расход глюкозы (г глюкозы/г астаксантина)	
	Конечный	Максимум		Конечный	Максимум	Конечная	Максимум	Конечное	Максимум
$D_{t0} = 5$ г/л FR = 5 г/ч	461,9	461,9 (92 ч)	221,9	2,1	4,1 (47 ч)	5,0	13,0 (27 ч - 47 ч)	476,2	243,9
$D_{t0} = 5$ г/л FR = 8,5 г/ч	587,3	587,3 (91 ч)	314,9	1,9	2,7 (49 ч)	6,5	11,7 (13 ч - 49 ч)	526,3	370,4
$D_{t0} = 5$ г/л FR = 12,5 г/ч	528,7	537,7 (70 ч)	350,9	1,5	2,1 (49 ч)	5,8	12,8 (13 ч - 49 ч)	666,7	476,2
$D_{t0} = 57$ г/л FR = 8,5 г/ч	468,2	544,1 (70 ч)	319,1	1,5	3,0 (47 ч)	5,1	14,6 (27 ч - 47 ч)	666,7	333,3

Максимальное содержание астаксантина (587,3 мг/л) и скорость его синтеза (6,5 г/л/ч) были достигнуты при исходной концентрации глюкозы (5 г/л) и скорости подпитки 8,5 г/ч (рисунок 27Б). Наилучший выход астаксантина на массу глюкозы был достигнут при самой низкой протестированной скорости подпитки 5 г/ч (рисунок 27А). В таких условиях выход составлял 2,1 мг астаксантина/г глюкозы, достигая 4,1 мг астаксантина/г глюкозы на 47 час процесса (таблица 11). Увеличение скорости подачи глюкозы до 12,5 г/ч привело к увеличению накопления биомассы, но снизило общее накопление и удельное содержание астаксантина, которые составили 537,7 мг/л и 6,7 мг/г сухого веса через 70 ч ферментации и 528,7 мг/л и 6,8 мг/г сухого веса через 92 ч (рисунок 27В). Примечательно, что образование кристаллов наблюдалось в одиночных клетках уже через 13 ч культивирования во всех биореакторах и отмечалось в большинстве клеток через 92 ч (рисунок 28А). В то время как кристаллы β -каротина имели волокнистую форму, кристаллы астаксантина первоначально формировались в виде игольчатых (или длинных призматических) структур. Большинство клеток содержали темно-красные кристаллы, но в редких единичных клетках выявлялись ярко-розовые скопления (рисунок 28Б, В).

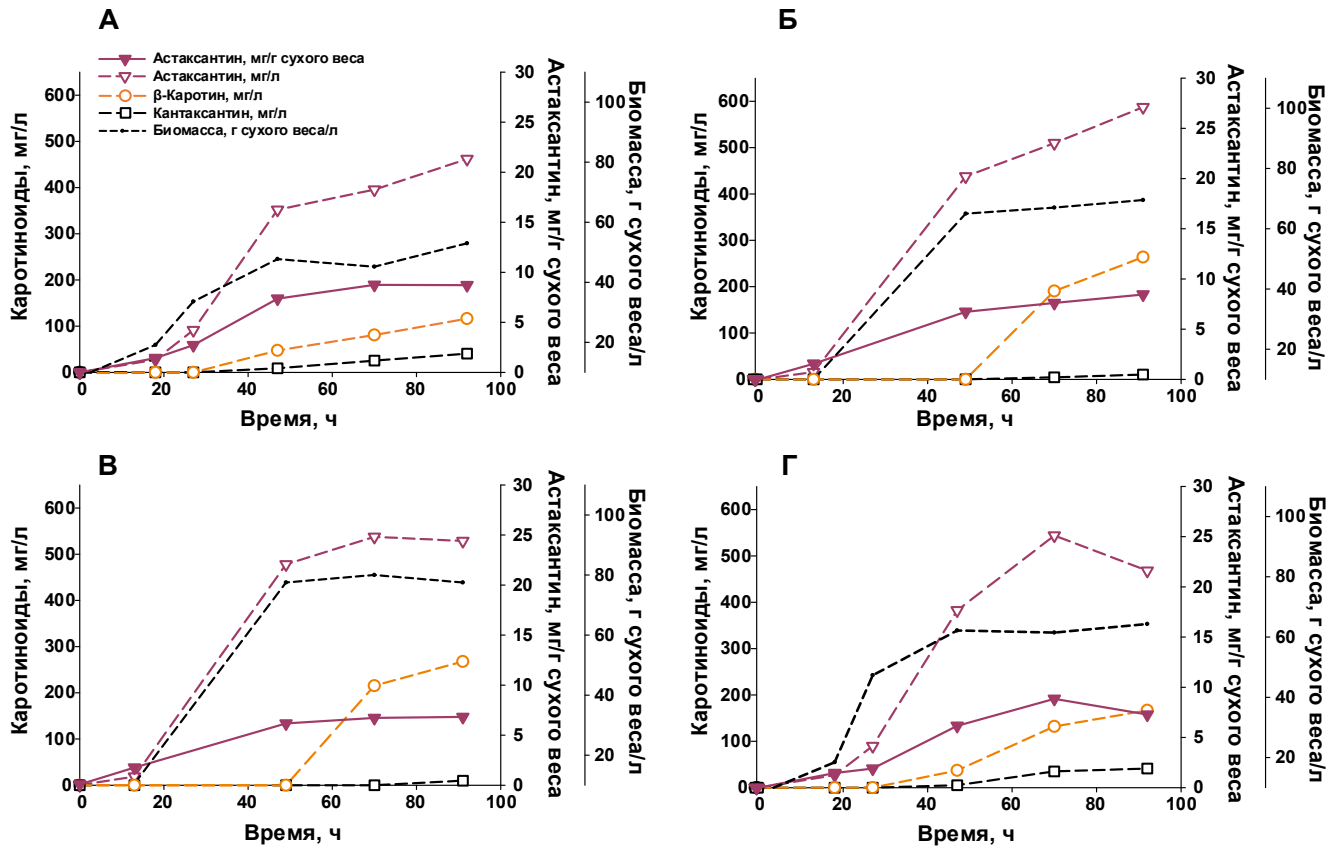


Рисунок 27. Культивирование штамма ВКПМ Y-4871 с периодической подпиткой в 3-литровых биореакторах с глюкозой в качестве источника углерода. Осуществлялась постоянная подпитка смесью глюкозы и гидро- и дигидрофосфатов аммония (как описано в материалах и методах). А - начальная концентрация глюкозы - 5 г/л и скорость подачи подпитки - 5 г/ч. Б - начальная концентрация глюкозы 5 г/л и скорость подачи подпитки - 8,5 г/ч. В - начальная концентрация глюкозы - 5 г/л и скорость подачи подпитки - 12,5 г/ч. Г - начальная концентрация глюкозы - 57 г/л и скорость подачи подпитки - 8,5 г/ч (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

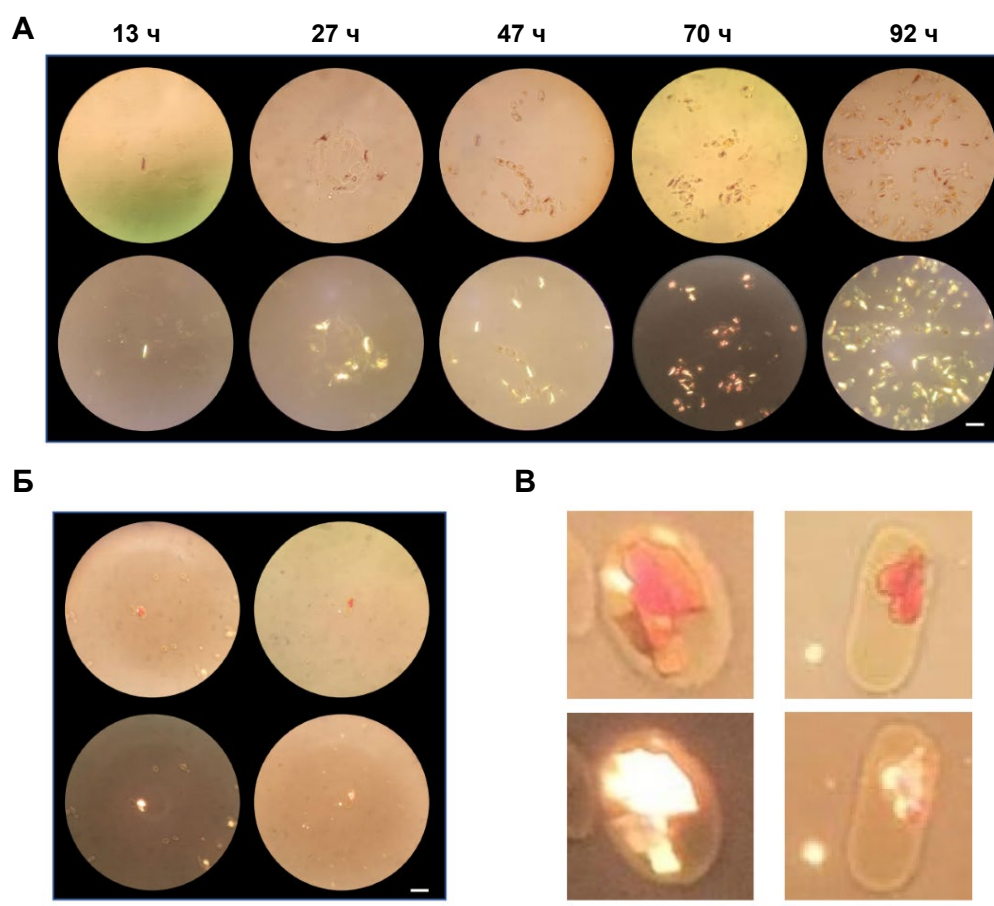


Рисунок 28. Микрофотография клеток штамма ВКПМ Y-4871. Микроскопировали клетки ВКПМ Y-4871, выращенные в 3-литровых биореакторах с глюкозой в качестве источника углерода (начальная концентрация глюкозы 5 г/л и скорость подачи подпитки - 12,5 г/ч). Верхнее изображение каждой пары было получено с помощью обычного освещения, нижнее – с помощью освещения поляризованным светом. А, анализ культуры в ходе процесса культивирования. С течением процесса культивирования видно образование кристаллов темно-красного цвета, характерного для астаксантина. Б, Клетки, внутри которых видны ярко-розовые кристаллы. В. Крупный план редких ярко-розовых кристаллов, показанных на рисунке. Масштабные полосы соответствуют 5 мкм (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Для дальнейшей оптимизации условий культивирования в биореакторе мы протестировали способность штамма ВКПМ Y-4871 к накоплению астаксантина с использованием глицерина в качестве источника углерода. Глицерин известен как основной побочный продукт в процессе производства биодизельного топлива, где его образуется около 10% (по массе от биодизельного топлива) (Yang *et al.*, 2012). Поэтому перспектива использования неочищенного глицерина как основного источника углерода для производства ценных химических соединений, таких как астаксантин, представляется привлекательной.

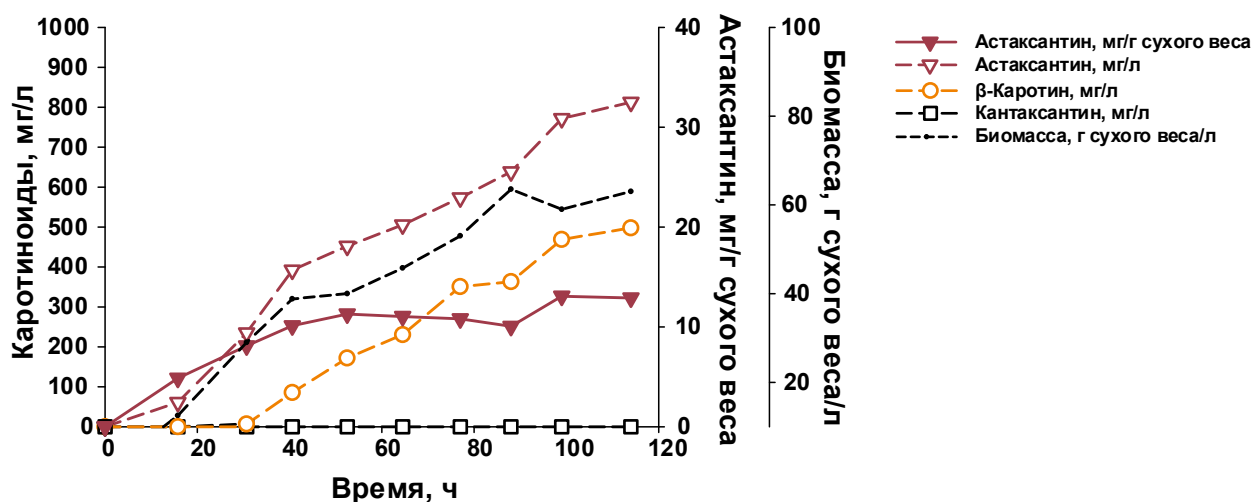


Рисунок 29. Периодическое культивирование штамма ВКПМ У-4871 с подпиткой в 100-литровом биореакторе с глицерином в качестве источника углерода. Начальная концентрация глицерина составляла 31 г/л, а непрерывную подачу смеси глицерина и гидро- и дигидрофосфатов аммония обеспечивали с расходом подпитки 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 (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Благодаря совместной работе с компаниями БиоКаи и Биомид было проведено культивирование в биореакторе объемом 100 л с исходным объемом культуры 35 л с глицерином в качестве источника углерода. Начальная концентрация глицерина составила 31 г/л, а скорость подачи подпитки смеси глицерина и гидро- и дигидрофосфатов аммония - 8,5 г/ч в течение первых 88 часов, затем – 16,5 г/ч в течение следующих 8 ч, с 96 ч до конца процесса - 12,5 г/ч). Штамм ВКПМ У-4871 смог достичь содержания астаксантина 392,3 мг/л (10,1 мг/г сухого веса) уже через 41 час культивирования (рисунок 29). В отрезке между 15 до 41 часом процесса скорость синтеза составила 13,4 мг/л/ч, что является максимальным значением, зарегистрированным на сегодняшний день. Двукратное увеличение скорости подпитки смесью глицерина и гидро- и дигидрофосфатов аммония с 88 ч культивирования привело к значительному увеличению титра и изменению содержания астаксантина с 638,3 мг/л и 10,1 мг/г сухого веса до 771,5 мг/л и 13,1 мг/г сухого веса на 99 ч культивирования, соответственно. Конечное содержание астаксантина на 114 час процесса составило 812,3 мг/л (12,9 мг/г сухого веса) (рисунок 29, приложение рисунок S7). ВЭЖХ-анализ материала, извлеченного из биомассы, полученной в ходе культивирования, показал, что весь полученный астаксантин соответствует (3S,3'S)-энантиомеру (рисунок 30).

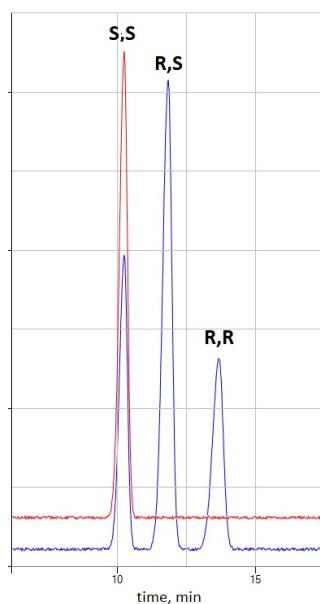


Рисунок 30. ВЭЖХ-анализ астаксантина, полученного в результате культивирования штамма ВКПМ Y-4871 в 100-литровых биореакторах. Красная кривая соответствует образцу астаксантина, извлеченного из биомассы штамма ВКПМ Y-4871, а синяя - синтетическому астаксантину. Синтетический астаксантин содержал смесь энантиомеров (3S,3'S), (3R,3'S) и (3R,3'R), а астаксантин, продуцируемый штаммом *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4871, был оптически гомогенным и содержал только (3S,3'S) энантиомер (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

В силу гидрофобности астаксантина возникло предположение о том, что добавление масла в питательную среду может снизить его накопление в клетках благодаря его растворению в масляной фазе. Это, в свою очередь, могло способствовать синтезу и упростить процесс экстракции продукта по окончании процесса. Для эксперимента использовали штамм ВКПМ Y-4871, который в результате инактивации гена *PEX10* не может утилизировать гидрофобные субстраты из-за отсутствия пероксисомы. Таким образом, ожидалось, что все экзогенное масло будет накапливаться в липидных каплях. Культивирование вели в режиме периодической ферментации с подпиткой в 3-литровых биореакторах в условиях, эквивалентных условиям эксперимента приведенном на рисунке 28А (начальная концентрация глюкозы 5 г/л и скорость непрерывной подачи подпитки 5 г/ч). Подпитка состояла из смеси глюкозы с гидро- и дигидрофосфатом аммония (как описано в материалах и методах). Были протестированы три схемы добавления оливкового масла. Так как ранее в 3-л биореакторах было зафиксировано начало формирования кристаллов уже через 13 часов культивирования, первой схемой добавления было порционное внесение 5% оливкового масла (об./начального об.) в начале процесса, через 76 и через 123 ч культивирования (рисунок 31А). Вторая схема предполагала смягчение потенциального негативного влияния жиров на рост *PEX10*-мутанта в случае добавления масла в начале ферментации. Она состояла из 3 последовательных внесений 5%

(об./начального об.) оливкового масла через 19 ч, 76 ч и 123 ч после начала культивирования (рисунок 31Б). Третья схема должна была способствовать максимально полной экстракции астаксантина из биомассы и включала в себя два внесения масла - 15% (об./начального об.) и 35% (об./начального об.) в начальный момент времени и через 72 ч после начала культивирования, соответственно (рисунок 31В). Культивирование во всех случаях продолжалось 165 часов. На рисунках 31А-В показано внутриклеточное накопление каротиноидов в зависимости от времени. Количественное определение внеклеточных каротиноидов в ходе процесса было затруднено из-за неоднородности культуральной жидкости, поэтому общее внеклеточное содержание оценивали в конечной точке ферментации путем экстракции из смеси масляной и водной фазы культуральной жидкости (таблица 12).

Как и ожидалось, внесение в питательную среду масла снизило внутриклеточное содержание каротиноидов по сравнению с экспериментом без масла (рисунки 31А-В и 28А). Интересно, что астаксантин был единственным каротиноидом, присутствующим в клетках вплоть до 120 часов для первой схемы добавления оливкового масла (рисунок 31А) и до 92 часов для второй схемы (рисунок 31Б), в то время как при культивировании без масла примесь β -каротина появляется уже к 48 часу процесса (рисунок 28А). Максимум внутриклеточного содержания астаксантина был достигнут к 141 ч ферментации и составил 537,0 мг/л и 517,7 мг/л для первой и второй схем добавления масла, соответственно. В эксперименте, в котором масло вносили на 0, 76 и 123 ч, суммарное содержание астаксантина на 168 ч процесса составило 973,4 мг/л, а выход - 2.8 мг/г глюкозы, что соответствует 357,1 г глюкозы/г астаксантина (таблица 12). Отсрочка первого внесения масла на 19 ч от начала процесса привела к значительному снижению количества астаксантина, извлеченного из всего надосадочного раствора, что свидетельствует о том, что секреция астаксантина становится значимой на ранних стадиях культивирования (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Анализ масляной фазы из эксперимента, в котором масло вносили по третьей схеме, показал, что астаксантин был единственным экстрагированным каротиноидом (рисунок 32, приложение рисунок S8). Концентрация астаксантина в масляной фазе составляла 157,7 мг/л через 94 часов и увеличивалась до 447,3 мг/л к 165 часу (рисунок 32). Внутриклеточное содержание астаксантина было значительно ниже, чем в первых двух экспериментах и сохранялось на уровне менее 1 мг/г сухого веса в течение всего процесса (рисунок 31В). Однако, общий титр был значительно снижен, вероятно, вследствие нарушения метаболических потоков, ведущих к синтезу ацетил-КоА и биосинтезу астаксантина (таблица 12).

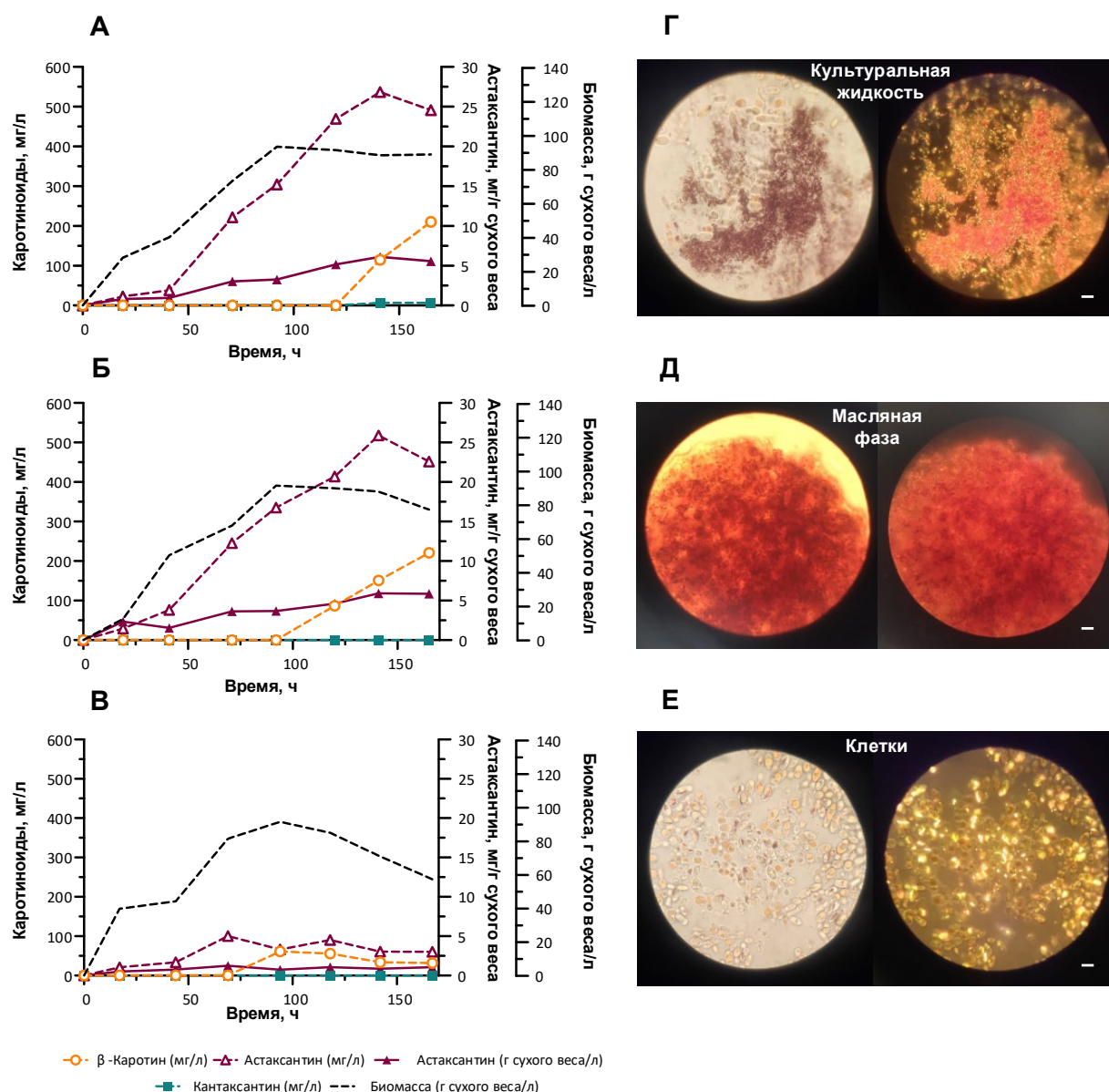


Рисунок 31. Культивирование штамма ВКПМ Y-4871 в 3-литровых биореакторах с глюкозой и добавлением оливкового масла. А – Динамика показателей при добавлении оливкового масла до конечной концентрации 5% (об./начального об.) в начальный момент времени, через 76 часов и 123 часа после начала процесса. Б - Динамика показателей при добавлении оливкового масла в конечной концентрации 5% (об./начального об.) через 19, 76 и 123 часа после начала процесса. В - Динамика показателей при добавлении оливкового масла до конечных концентраций 15% и 35% (об./начального об.) через 0 ч и 72 ч соответственно. Г - астаксантин в культуральной жидкости, Д - астаксантин в верхней масляной фазе, Е - астаксантин в предварительно промытых водой клетках. Образец для микроскопии отбирали на 142 час культивирования из биореактора, в который вносили оливковое масло в количестве 5% (об./начального об.) в начальный момент времени, через 76 ч и 123 ч после начала процесса. Изображения слева получены с помощью освещения обычным светом, справа – поляризованным. Масштабная линейка соответствует 5 мкм (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Таблица 12. Конечные показатели процессов культивирования штамма ВКПМ У-4871 с подпиткой в 3-литровых биореакторах с начальной концентрацией глюкозы 5 г/л, скоростью подачи 5 г/ч и последовательным добавлением оливкового масла.

Схема добавления масла	Внутриклеточный титр (мг/л)		Внеклеточный титр (мг/л)		Общий титр астаксантина (мг/л)	Скорость синтеза (мг/л/ч)	Выход астаксантина (мг/г глюкозы)	Потребление глюкозы (г/л)	Удельный расход глюкозы (г/г астаксантина)
	астаксантин	β -каротин	астаксантин	β -каротин					
0 ч (5%) 76 ч (5%) 123 ч (5%)	491,2	210,1	482,2	153,2	973,4	5,9	2,8	344,5	357,1
19 ч (5%) 76 ч (5%) 123 ч (5%)	451,7	220,6	244,4	104,9	696,1	4,2	2,0	341,0	500,0
0 ч (15%) 72 ч (35%)	60,3	31,6	255,2	57,4	315,5	1,9	1,6	198,1	625,0

Во всех случаях добавление оливкового масла способствовало секреции астаксантина, который обнаруживался в виде кристаллов в водной фазе культуральной жидкости (рисунок 31Г), а также в растворенной форме - в верхней масляной фазе (рисунок 31Д). Тем не менее, кристаллы все еще присутствовали внутри клеток на последних стадиях культивирования (рисунок 31Е).

Таким образом, приведенные в этой работе подходы позволяют эффективно производить астаксантин в крупном масштабе, в отличие от подходов, описанных в научной литературе. Например, в работе (Zhu *et al.*, 2022) выполненной на *Y. lipolytica* сообщается о достижении содержания астаксантина на уровне 3,3 г/л при культивировании в 5-литровых биореакторах на 264 час, тогда как в настоящей работе удалось добиться конечной концентрации 812,3 мг/л в 100-литровых биореакторах чуть более чем за 120 часов. Более того, внесение оливкового масла позволило дополнительно повысить конечное содержание астаксантина. Вместе с тем, в упомянутом исследовании штамм культивировали с периодической подпиткой очень богатой средой YAG. Использование среды YAG неприменимо в промышленном производстве из-за чрезмерной стоимости необходимой ферментационной среды. Необходимость в использовании такой среды может быть связана с тем, что компоненты этой среды могут снизить нагрузку на биосинтетические процессы в клетке, возникшие в следствии интеграции чрезвычайно большого

количества копий гетерологичных генов, а именно по 20 копий *HpCrtW* и *HpCrtZ*. Введение в сумме 40 копий гетерологичных генов вместе с другими генетическими модификациями, вероятно, может вызывать очень высокую нагрузку на аппарат трансляции (Eguchi *et al.*, 2018; Kastberg *et al.*, 2022), что, в свою очередь, может иметь отрицательное влияние на накопление астаксантина и рост биомассы из-за перегрузки процессов синтеза белка.

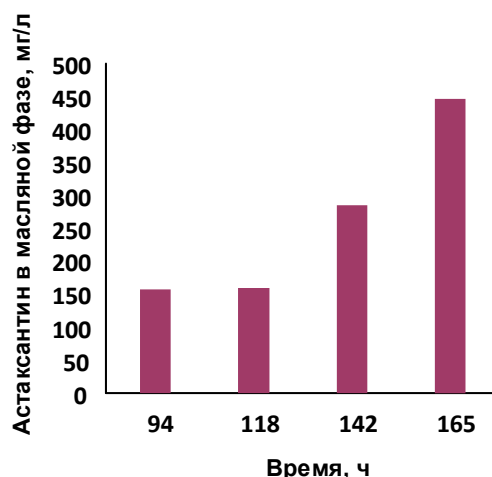


Рисунок 32. Содержание астаксантина в масляной фазе, собранной в разные моменты времени культивирования штамма ВКПМ Y-4871 в условиях внесения оливкового масла в количестве 15% (об./начального об.) и 35% (об./начального об.) в начала процесса и через 72 ч культивирования, соответственно. Показаны средние значения трех технических повторностей (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

В предыдущих исследованиях по разработке новых методов биосинтеза астаксантина на *Y. lipolytica* стандартной практикой было использование избыточно богатых и дорогостоящих питательных. Например, Ма с соавторами использовали периодическую подпитку средой YPD для достижения титра астаксантина 858 мг/л почти через 300 часов при ферментации в колбах, наблюдая значительное снижение продукции при масштабировании до 3-литровых биореакторов, в которых накопление составило 453 мг/л через 240 часов. Напротив, штамм и методики, представленные здесь, требуют только периодической подачи фосфата аммония и источника углерода, такого как глюкоза или глицерин. Таким образом, описанные в этой работе подходы могут позволить производить природный астаксантин в промышленных масштабах. Применение дешевых питательных сред и возможность масштабирования процесса, которые часто упускают из виду при разработке новых стратегий биосинтеза, действительно являются ключевыми характеристиками для внедрения новой методологии в промышленную практику.

В отличие от химического синтеза, в котором возможно получение только смеси 3S,3'S-, 3S,3'R- и 3R,3'R-астаксантина (Zhu *et al.*, 2022), в данной работе на *Y. lipolytica* показано

получение природного астаксантина, который не содержит эндотоксинов и представляет собой чистый 3S,3'S изомер (рисунок 31).

III. 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, β -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 *DGKI* 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 β -каротина конструировали путем оптимизации мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов, экспрессии генов пути биосинтеза β -каротина *CarRP* и *CarB* *M. circinelloides* и слитых генов *fusCarRP-GGPPs7* и *fusCarRP-ERG20^{F88C}*. При культивировании полученного штамма ВКПМ Y-4950 в биореакторе было впервые показано внутриклеточное образование кристаллов β -каротина на дрожжах. Затем, на основе штамма-продуцента β -каротина был получен штамм, накапливающий астаксантин. Для этого в геном штамма GBK4 интегрировали гены *HpBKT* и *HpCriZ* *H. pluvialis*, слитые гены *fusCarRP-GGPPs7* и *fusCarRP-ERG20^{F88C}*, в результате чего был получен штамм ВКПМ Y-4871. Несмотря на то, что слияние генов, контролирующих реакции биосинтеза β -каротина было эффективной стратегией для повышения конечного титра астаксантина и β -каротина, слияние β -каротингидроксилазы и β -каротинкетотазы 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 β -каротингидроксилазы и β -каротинкетотазы 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 β -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.

IV. 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 взаимодополнительных 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 β -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^{F88C}*, (где *CarRP M. circinelloides*, кодирует бифункциональный фермент фитоенсинтазу/ликопин- β -циклазу, *GGPPs7 Synechococcus* sp. кодирует геранилгеранилдифосфатсинтазу, мутантный аллель *Y. lipolytica ERG20^{F88C}* кодирует фарнезилдифосфатсинтазу), контролирующих сопряженные этапы метаболизма каротиноидов при генетическом конструировании продуцентов астаксантина и β -каротина.
6. Получены рекомбинантные штаммы *Y. lipolytica* продуценты астаксантина и β -каротина по уровню продуктивности сопоставимые с лучшим мировым аналогом и перспективные для использования при разработке промышленных биотехнологий производства этих каротиноидов.

V. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВКПМ – Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

п.н. – пары нуклеотидов.

α-AgBS – ген *Abies gruis*, кодирующий α -бисаболенсинтазу;

β-ZoBS – ген *Zingiber officinale*, кодирующий β -бисаболенсинтазу;

γ-HaBS – ген *Helianthus annuus*, кодирующий γ -бисаболенсинтазу;

AaADS – ген *Artemisia annua*, кодирующий аморфадиеенсинтазу;

AacrtZ – ген *Agrobacterium aurantiacum*, кодирующий β -каротингидроксилазу;

AaFS – ген *Artemisia annua*, кодирующий фарнезенсинтазу;

AaLIS – ген *Actinidia arguta*, кодирующий линалоолсинтазу;

ACBP – ген *Y. lipolytica*, кодирующий ацил-КоА-связывающий белок;

ACCI – ген *Y. lipolytica*, кодирующий ацетил-КоА-карбоксилазу;

ACL1 – ген *Y. lipolytica*, кодирующий АТФ-зависимую цитратлиазу 1;

ACS2 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий ацетил-кофермент А-синтетазу 2;

ADE2 – ген *Y. lipolytica*, кодирующий фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазу;

ADH2 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий алкогольдегидрогеназу II;

AgGPPS2 – ген *Abies grandis*, кодирующий геранилдифосфатсинтазу (*tAgGPPS2* – укороченный вариант гена *AgGPPS2*, *AgGPPS^{D90G-L175P}* - версия гена с аминокислотными заменами);

ALD6 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий ацетальдегиддегидрогеназу;

AMPD – ген *Y. lipolytica*, кодирующий фермент аденозинмонофосфатдеаминазу;

AraDH1 – ген *Y. lipolytica*, кодирующий D-арабитол-дегидрогеназу;

AraDH2 – ген *Y. lipolytica*, кодирующий D-арабитол-дегидрогеназу;

ArtLS – ген *Agastache rugosa*, кодирующий лимоненсинтазу;

- AspcrtW* – ген *Alcaligenes* sp., кодирующий β-каротинкетотлазу;
- AtATR1* – ген *Arabidopsis thaliana*, кодирующий НАДФН-цитохром P450 редуктазу 1;
- AtCPR1* – ген *A. thaliana*, кодирующий НАДФН-цитохром P450 редуктазу;
- AtoB* – ген *E. coli*, кодирующий ацетил-КоА-ацетилтрансферазу;
- AvcrtW* – ген *Anabaena variabilis*, кодирующий β-каротинкетотлазу;
- Bbpc* – ген *Bifidobacterium bifidum*, кодирующий фосфокетотлазу;
- BFS* – ген *Artemisia annua*, кодирующий фермент фарнезилдифосфатсинтазу;
- BjHMGs* – ген *Brassica juncea*, кодирующий гидроксиметилглутарил-КоА-синтазу;
- bLIS* – ген *Streptomyces clavuligerus*, кодирующий линалоолсинтазу;
- BPLO* – ген *Betula platyphylla*, кодирующий лупеол-С-28-оксидазу;
- BscrtW* – ген *Brevundimonas* sp., кодирующий β-каротинкетотлазу;
- Bsdxs* – ген *Bacillus subtilis*, кодирующий 1-дезоксид-Д-ксилозу-5-фосфатсинтазу;
- Bsfni* – ген *B. subtilis*, кодирующий изопентенилдифосфат-дельта-изомераза;
- Bspta* – ген *B. subtilis*, кодирующий фосфотрансацетилазу;
- BtCrtI* – ген *Blakeslea trispora*, кодирующий фитоендесатуразу;
- BTS1* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу;
- BvcrtW* – ген *Brevundimonas vesicularis*, кодирующий β-каротинкетотлазу;
- CarB* – ген *M. circinelloides*, кодирующий фитоендегидрогеназу;
- CarRP* – ген *M. circinelloides*, кодирующий бифункциональный фермент фитоенсиназу/ликопин-β-циклазу (*CarRP^{E78K}* и *CarRP^{Y27R}* – аллели *CarRP* с аминокислотными заменами);
- Cathl* – ген *Clostridium acetobutylicum*, кодирующий тиолазу;
- CfTPS1* – ген *Coleus forskohlii* (*Plectranthus barbatus*), кодирующий дитерпенсинтазу класса II;
- CILS1* и *CILS2* – гены *Citrus limon*, кодирующие лимоненсинтазу (*CitLS2* – укороченная версия гена *CILS2*);
- CISTS* – ген *Clausena lansium*, кодирующий α-санталенсинтазу;

- CK* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий холинкиназу;
- Ckpta* – ген *Clostridium kluyveri*, кодирующий фосфотрансацетилазу;
- CnVS* – ген *Callitropsis nootkatensis*, кодирующий валенсинсинтазу;
- CPP* - хризантемилдифосфат;
- CrGPPS* – ген *Catharanthus roseus*, кодирующий геранилдифосфатсинтазу;
- CrGES* – ген *C. roseus*, кодирующий гераниолсинтазу (*t3CrGES* – укороченная версия гена);
- crtX* – ген *Pantoea ananas (Erwinia uredovora)*, кодирующий зеаксантин-глюкозилтрансферазу;
- CSSI* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий белок неизвестной функции, секретируемый при конститутивной экспрессии;
- CYP706M1* – ген *Alaska cedar (Callitropsis nootkatensis)*, кодирующий (+)-нооткатонсинтазу;
- CYP76AH1* – ген *Salvia miltiorrhiza*, кодирующий ферругинолсинтазу;
- DGA1* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий диацилглицерин-О-ацилтрансферазу 1;
- DGA2* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий диацилглицерин-О-ацилтрансферазу 2;
- DGK1* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий диацилглицеролкиназу;
- DMAPP* – диметилаллилдифосфат;
- DPP1* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий диацилглицеролпирофосфатфосфатазу 1;
- DrDHCR7* – ген *Danio rerio*, кодирующий 7-дегидрохолестеринредуктазу;
- dNTP* – дезоксирибонуклеозидтрифосфат;
- DTT* – дитиотреитол;
- DwcrB* – ген *Deinococcus wulumuqiensis*, кодирующий фитоенсинтазу;
- DwcrE* – ген *D. wulumuqiensis*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу;
- DwcrI* – ген *D. wulumuqiensis*, кодирующий фитоендесатуразу;
- dxr* – ген *E. coli*, кодирующий 1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфатредуктоизомеразу;
- dxs* – ген *E. coli*, кодирующий 1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфатсинтазу;
- Dzada* – ген *Dickeya zeaе*, кодирующий ацетальдегиддегидрогеназу;

- DzeutE* – ген *D. zeaе*, кодирующий альдегиддегидрогеназу;
- Ecidi* – ген *E. coli*, кодирующий изопентенилдифосфат-дельта-изомеразу;
- EfmvaE* – ген *Enterococcus faecalis*, кодирующий ацетил-КоА-ацетилтрансферазу/гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазу;
- EfmvaS* – ген *E. faecalis*, кодирующий гидроксиметилглутарил-КоА-синтазу;
- EhcrtB* – ген *Erwinia herbicola*, кодирующий фитоеенсинтазу;
- EhcrtE* – ген *E. herbicola*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу;
- EhcrtI* – ген *E. herbicola*, кодирующий фитоендегидрогеназу;
- EhcrtY* – ген *E. herbicola*, кодирующий ликопин-бета-циклаза;
- ERG1* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий скваленмонооксигеназу;
- ERG7* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий ланостеролсинтазу;
- ERG5* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий стерол-С-22-десатуразу;
- ERG8* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий фосфомевалонаткиназу;
- ERG10* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий ацетил-КоА С-ацетилтрансферазу;
- ERG12* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий мевалонаткиназу;
- ERG13* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-синтазу;
- ERG19* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий мевалонатдифосфатдекарбоксилазу;
- ERG20* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий фарнезилдифосфатсинтазу;
- FPP – фарнезилдифосфат;
- FS* - ген из семян яблока *Malus domestica*, кодирующий α -фарнезенсинтазу (GenBank: MZ343331);
- Fsso* – ген из соевых бобов *Glycine max*, кодирующий α -фарнезенсинтазу (GenBank: MT559750);
- GAL4* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий галактозозависимый фактор транскрипции;
- GAL4M9* –аллель *GAL4*, кодирующий температурочувствительный белок;
- GcABC-G1* – ген *Grosmania clavigera*, продукт которого является компонентом АТФ-зависимого (ABC) транспортера;

GgBAS – ген *Glycyrrhiza glabra*, кодирующий β-амиринсинтазу;

GGPP – геранилгеранилдифосфат;

GGS1 – ген *Y. lipolytica*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу;

GPD1 – ген *Y. lipolytica*, кодирующий глицерин-3-фосфатдегидрогеназу;

GPP – геранилдифосфат;

HMG1 – ген *Y. lipolytica*, кодирующий 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу (*tHMG1* – укороченная версия гена *HMG1*);

HMGS1 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий гидроксиметилглутарил-КоА-синтазу;

HpBKT – ген *Haematococcus pluvialis*, кодирующий β-каротинкетолазу;

HpCrtZ – ген *Haematococcus pluvialis*, кодирующий фермент β-каротингидролазу (*HpCrtZ^{L288R}* – мутантный вариант *HpCrtZ* с аминокислотной заменой);

hph – ген *E. coli*, кодирующий фосфотрансферазу гигромицина В;

HXK1 – ген, кодирующий гексокиназу;

IDI – ген *Y. lipolytica*, кодирующий изопентенилдифосфат-дельта-изомеразу;

IPK – ген *Arabidopsis thaliana*, кодирующий изопентенилфосфаткиназу;

IPM - изопропилмиристат;

IPP – изопентенилдифосфат;

ipiHPI – ген *H. pluvialis*, кодирующий изопентенилдифосфатизомеразу;

IPTG – изопропил β-d-1-тиогалактопиранозид;

ispA – ген *E. coli*, кодирующий фарнезилдифосфатсинтазу

ispD – ген *E. coli*, кодирующий фермент 2-С-метил-D-эритрит-4-фосфатцитидилтрансферазу;

ispF – ген *E. coli*, кодирующий фермент 2-С-метил-D-эритритол 2,4-циклодифосфатсинтазу;

KDEL - С-концевая нуклеотидной последовательность 5'-AAGGACGAGCTG-3, направляющая к эндоплазматическому ретикулу;

KU70 – ген, продукт которого участвует в негомологичном соединении концов молекулы ДНК;

LEU2 – ген *Y. lipolytica*, кодирующий 3-изопропилмалатдегидрогеназу;

- LjCPR* – ген *Lotus japonicus*, кодирующий НАДФН-цитохром Р450 редуктазу;
- Lmpk* – ген *Leuconostoc mesenteroides*, кодирующий фосфокетолазу;
- LPP1* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий фосфатазу фосфолипидов 1;
- MEP – метилэритритолфосфатный путь синтеза терпенов и их производных;
- MFE1* - ген, кодирующий многофункциональный фермент, участвующий в β-окислении липидов;
- McLIS* – ген *Mentha citrata*, кодирующий линалоолсинтазу (*t67OMcLIS* – укороченная версия гена, *t67OMcLIS^{E343D-E352H}* - укороченная версия гена с аминокислотными заменами);
- mk* – ген *E. coli*, кодирующий мевалонаткиназу;
- Mpmvk* - ген *Microbacterium paludicola*, кодирующий мевалонаткиназу;
- MrBBS* – ген *Matricaria recutita*, кодирующий (-)-α-бисабололсинтазу;
- MsLS* – ген *Mentha spicata*, кодирующий l-лимоненсинтазу (укороченный вариант гена *tMsLS*);
- MtCYP716A12* – ген *Medicago truncatula*, кодирующий цитохром Р450;
- MVA – мевалонатный путь синтеза терпенов и их производных;
- MVD* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий дифосфомевалонатдекарбоксилазу;
- NPP – нерилдифосфат;
- OBKTM29* – ген *H. pluvialis*, кодирующий мутантный вариант β-каротинкетотазы с аминокислотными заменами H165R/ V264D/ F298Y/ M1T/ N188D/ L271R;
- OLE1* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий Δ⁹-десатуразу жирных кислот;
- PacrtB* – ген *Pantoea agglomerans*, кодирующий фитоенсинтазу;
- PacrtE* – ген *P. agglomerans*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу;
- PacrtI* – ген *P. agglomerans*, кодирующий фитоендесатуразу;
- PacrtY* – ген *P. agglomerans*, кодирующий β-циклазу ликопина;
- PacrtZ* – ген *P. ananatis*, кодирующий β-каротингидролазу;
- PagcrtZ* – ген *P. agglomerans*, кодирующий β-каротингидролазу;
- PAH1* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий фосфатидатфосфатазу;

- PancrtY* – ген *P. ananatis*, кодирующий β -циклазу ликопина;
- PAT1* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий ацетил-КоА-ацетилтрансферазу;
- PDR3* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий белок плеiotропной лекарственной устойчивости 3;
- PfLS* – ген *Perilla frutescens*, кодирующий лимоненсинтазу;
- PgDS* – ген *Panax ginseng*, кодирующий фермент синтазу даммарендиола II;
- PgPPDS* – ген *P. ginseng*, кодирующий 20(S)-протопанаксадиолсинтазу;
- PgUGT1* – ген *P. ginseng*, кодирующий UDP-гликозилтрансферазу;
- PhCCD1* – ген *Petunia hybrida*, кодирующий диоксигеназу, расщепляющую каротиноиды (*PhCCD1*^{K164L} – ген *PhCCD1* с аминокислотной заменой);
- PhoB* – *P. ananatis* транскрипционный регуляторный белок фосфатного регулона (локус PAJ_0278);
- RphoC* – промотор *P. ananatis*, индуцируемый истощением неорганического фосфата в среде (локус PAJ_0425);
- PpttgB* – ген *Pseudomonas putida* KT2440, кодирующий мембранный транспортер толуола;
- PM^{SeV-C}* – анкер плазматической мембраны, состоящей из последовательности белка *Sendai virus* C;
- POT1* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий 3-кетоацил-КоА-тиолазу;
- POX 1-6* – пероксисомальные гены *Y. lipolytica*;
- PscrtW* – ген *Paracoccus* sp., кодирующий β -каротинкетолазу;
- PtPS* – ген *Pinus taeda*, кодирующий α -пиненсинтазу (*tPtPS* укороченный вариант гена *PtPS*, *PtPS*^{Q457L} – версия гена *PtPS* с аминокислотными заменами);
- RAD52* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий белок репарации и рекомбинации ДНК RAD52;
- RcLUS* – ген *Ricinus communis*, кодирующий лупеолсинтазу;
- RIAD* и *RIDD* – пара коротких пептидных меток, с высокой аффинностью связывания, спонтанно образующие комплекс в соотношении 1:2 *in vivo*;
- SaGGPS* – ген *Sulfolobus acidocaldarius*, кодирующий изопентенилтрансферазу;
- Seacs* – ген *Salmonella enterica*, кодирующий ацетил-КоА синтазу;

ScERG8 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий фосфомевалонаткиназу;

ScERG9 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий скваленсинтазу (*tScERG9* – укороченный вариант гена *ScERG9*);

ScERG12 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий мевалонаткиназу;

ScERG13 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-синтазу;

ScERG19 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий мевалонатдифосфатдекарбоксилазу;

ScERG20 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий фарнезилдифосфатсинтазу (*ScERG20^{N127W}* и *ScERG20^{F96W-N127W}* - версии гена *ScERG20* с аминокислотными заменами);

ScIDI – ген *S. cerevisiae*, кодирующий изопентенилдифосфат-дельта-изомеразу;

ScMDV – ген *S. cerevisiae*, кодирующий дифосфомевалонатдекарбоксилазу;

ScPMK – ген *S. cerevisiae*, кодирующими фосфомевалонаткиназу;

ScSUC2 – ген *S. cerevisiae*, кодирующий инвертазу;

SKIK – N-концевая метка, кодирующая Ser-Lys-Ile-Lys;

SINDPS1 – ген *Solanum lycopersicum*, кодирующий нерилдифосфатсинтазу 1 (укороченный вариант гена *tSINDPS1*);

SlINDPS1 – укороченный вариант гена *Solanum lycopersicum*, кодирующий нерилдифосфатсинтазу;

SmCPR1 – ген *Salvia Miltiorrhiza*, кодирующий цитохром P450 редуктазу;

SmCPS – ген *S. Miltiorrhiza*, кодирующий лабдадиенил/копалилдифосфатсинтазу;

SmKSL1 – ген *S. Miltiorrhiza*, кодирующий каурен-подобную синтазу класса I (*tSmKSL1* - укороченный вариант гена *SmKSL1*);

Sphmg – ген *Silicibacter pomeroyi*, кодирующий 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу, специфичную к НАДН;

SpHXX1 – ген *Schizosaccharomyces pombe*, кодирующий гексокиназу;

SpmvaD – ген *Streptococcus pneumoniae*, кодирующий дифосфомевалонатдекарбоксилазу;

SpmvaK1 – ген *S. pneumoniae*, кодирующий мевалонаткиназу;

SpmvaK2 – ген *S. pneumoniae*, кодирующий фосфомевалонаткиназу;

- GGPPs7* – ген *Synechococcus* sp., кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу;
- SQE* – ген, кодирующий эпоксидазу сквалена;
- SQS* – ген, кодирующий скваленсинтазу;
- SsXYL1* – ген *Scheffersomyces stipitis*, кодирующий ксилоредуктазу XR;
- SsXYL2* – ген *S. stipitis*, кодирующий ксилоредуктазу XDH;
- ScXKS1* – ген *S. cerevisiae*, кодирующий ксилулозокиназу;
- TAL* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий трансальдолазу;
- TGL44* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий триацилглицероллипазу 4;
- TKL* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий транскетолазу;
- TmCrtE* – ген *Taxus x media*, кодирующий геранилгеранилдифосфатсинтазу;
- TX* – ген *S. stipitis*, кодирующий транспортер ксилозы;
- tScHMG1* – укороченный вариант гена *S. cerevisiae*, кодирующий 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу;
- tsr* – ген *E. coli*, кодирующий сериновый хеморецепторный белок;
- URA3* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу;
- VHb* – ген *Vitreoscilla stercoraria*, кодирующий бактериальный гемоглобин;
- XdCrtE* – ген *X. dendrorhous*, кодирующий геранилгеранил-дифосфат синтазу (*XdCrtE*^{C81T-A908G} – версия гена *XdCrtE* с аминокислотными заменами);
- XdCrtI* – ген *X. dendrorhous*, кодирующий фитоеендесатуразу;
- XdCrtYB* – ген *X. dendrorhous*, кодирующий бифункциональную ликопинциклазу/фитоеенсинтазу;
- YLACL2* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий АТФ-зависимую цитратлиазу 2;
- Zmpdc* - ген *Zygomonas mobilis*, кодирующий пируватдекарбоксилазу;
- ZWF1* – ген *Y. lipolytica*, кодирующий глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу;

VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грандберг, И. И. Органическая химия: Учеб. для студ. вузов, обучающихся по агроном, спец./ Грандберг, И. И. — 4-е изд., перераб. и доп. — Москва : Дрофа, 2001. — 672 с. — Библиогр.: 20 см. — с. 250-251. — 10 000 экз. ISBN 5-7107-3954-5. — Текст : непосредственный.
2. Патент № 2794980 Российская федерация, МПК C07K 19/00 (2006.01), C12N 15/81 (2006.01), C12P 23/00 (2006.01). Модифицированная нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий активностью фитоен синтазы и геранилгеранилпирофосфат синтазы (варианты), ее использование при конструировании трансформантов дрожжей *Yarrowia lipolytica*, продуцирующих каротиноиды : № 2021137138 : заявл. 15.12.2021: опубл. 26.04.2023 / Юзбашева Е. Ю., Таратынова М. О., Косихина Ю. М., Юзбашев Т. В., Дементьев Д. А., Андреева Н. И., Федоров А. С., Синеокий С. П. — 34 с. : ил. — Текст : непосредственный.
3. Патент № 2809554 Российская федерация, МПК C12N 1/19 (2006.01), C12N 15/52 (2006.01), C12N 15/81 (2006.01), C12P 7/04 (2006.01). Трансформант дрожжей *Yarrowia lipolytica*, продуцирующий линалоол : № 2022130691: заявл. 25.11.2022 : опубл. 12.12.2023 / Таратынова М. О., Юзбашева Е. Ю., Дементьев Д. А., Синеокий С. П., Федяева Ю. М. — 16 с. : ил. — Текст : непосредственный.
4. Племенков, В. В. Химия изопреноидов. глава 5. Монотерпены / В. В. Племенков // Химия растительного сырья. — 2006. — № 2. — С. 63-87.
5. Abdel-Mawgoud, A. M. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica* / A. M. Abdel-Mawgoud, K. A. Markham, C. M. Palmer, N. Liu, G. Stephanopoulos, H. S. Alper // Metab Eng. — 2018. — V. 50. — P. 192-208. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.016>
6. Abu-Lafi, S. Reproducibility of the separation of astaxanthin stereoisomers on Pirkle covalent L-leucine and D-phenylglycine columns/ S. Abu-Lafi, S. A. Turujman // J Chromatogr A — 1999. — V. 855(1). — P. 157-170. [https://www.doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00700-1](https://www.doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00700-1)
7. Arendt, P. An endoplasmic reticulum-engineered yeast platform for overproduction of triterpenoids/ P. Arendt, K. Miettinen, J. Pollier, R. De Rycke, N. Callewaert, A. Goossens // Metab Eng. — 2017. — V. 40. — P. 165-175. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2017.02.007>
8. Arnesen, J. A. *Yarrowia lipolytica* Strains Engineered for the Production of Terpenoids / J. A. Arnesen, K. R. Kildegaard, M. Cernuda Pastor, S. Jayachandran, M. Kristensen, I. Borodina // Front Bioeng Biotechnol. — 2020. — V. 8. — P. 945-958. <https://www.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00945>
9. Ashour, M. “Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes и diterpenes,” in Biochemistry of Plant Secondary Metabolism / M. Ashour, M. Wink, J. Gershenzon // ed. M.

- Wink (Oxford: Wiley-Blackwell). – 2010. – P. 258-303.
<https://www.doi.org/10.1002/9781444320503.ch5>
10. Barth, G. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica* / G. Barth, C. Gaillardin // FEMS Microbiol Rev. – 1997. – V. 19(4). – P. 219-237.
<https://www.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>
 11. Bogacz-Radomska L. β -Carotene—properties and production methods / L. Bogacz-Radomska, J. Harasym // Food Quality and Safety. – 2018. – V. 2(2). – P. 69-74.
<https://www.doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>
 12. Boronat, A. Terpenoid biosynthesis in prokaryotes / A. Boronat, M. Rodriguez-Concepcion // Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2015. – V. 148. – P. 3-18.
https://www.doi.org/10.1007/10_2014_285
 13. Borsenberger, V. Multiple Parameters Drive the Efficiency of CRISPR/Cas9-Induced Gene Modifications in *Yarrowia lipolytica* / V. Borsenberger, D. Onesime, D. Lestrade, C. Rigouin, C. Neueglise, F. Daboussi, F. Bordes // J Mol Biol. – 2018 – V. 430(21). – P. 4293-4306.
<https://www.doi.org/10.1016/j.jmb.2018.08.024>
 14. Cao, X. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction / X. Cao, Y. B. Lv, J. Chen, T. Imanaka, L. J. Wei, Q. Hua // Biotechnol Biofuels. – 2016. – V. 9. – P. 214-224. <https://www.doi.org/10.1186/s13068-016-0626-7>
 15. Cao, X. Enhancing linalool production by engineering oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* / X. Cao, L. J. Wei, J. Y. Lin, Q. Hua // Bioresour Technol. – 2017. – V. 245(Pt B). – P. 1641-1644.
<https://www.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.105>
 16. Capelli, B. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement / B. Capelli, D. Bagchi, G. R. Cysewski // Nutrafoods. – 2013. – V. 12(4). – P. 145-152.
<https://www.doi.org/10.1007/s13749-013-0051-5>
 17. Celinska, E. Golden Gate Assembly system dedicated to complex pathway manipulation in *Yarrowia lipolytica*. / E. Celinska, R. Ledesma-Amaro, M. Larroude, T. Rossignol, C. Pauthenier, J. M. Nicaud // Microb Biotechnol. – 2017. – V. 10(2). – P. 450-455.
<https://www.doi.org/10.1111/1751-7915.12605>
 18. Chen, H. High production of valencene in *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering/ H. Chen, C. Zhu, M. Zhu, J. Xiong, H. Ma, M. Zhuo, S. Li // Microb Cell Fact. – 2019. – V. 18(1). – P. 195-208. <https://www.doi.org/10.1186/s12934-019-1246-2>
 19. Chen, M. Construction of Canthaxanthin-Producing Yeast by Combining Spatiotemporal Regulation and Pleiotropic Drug Resistance Engineering / M. Chen, M. Li, L. Ye, H. Yu // ACS Synth Biol. – 2022. – V. 11(1). – P. 325-333. <https://www.doi.org/10.1021/acssynbio.1c00437>

20. Chen, S. Efficient production of the beta-ionone aroma compound from organic waste hydrolysates using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain. / S. Chen, Y. Lu, W. Wang, Y. Hu, J. Wang, S. Tang, C. S. K. Lin, X. Yang // *Front Microbiol.* – 2022. – V. 13. – P. 960558-960568. <https://www.doi.org/10.3389/fmicb.2022.960558>
21. Chen, T. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for pinene production / T. Chen, R. Zhang, G. Jiang, M. Yao, H. Liu, Y. Wang, W. Xiao, Y. Yuan // *CIESC Journal.* – 2019 – V. 70(1). – P. 179-188. <https://www.doi.org/10.11949/j.issn.0438-1157.20180784>
22. Cheng B.-Q. Elevating Limonene Production in Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* via Genetic Engineering of Limonene Biosynthesis Pathway and Optimization of Medium Composition/ B.-Q. Cheng, L.-J. Wei, Y.-B. Lv, J. Chen, Q. Hua // *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* – 2019. – V. 24(3). – P. 500-506. <https://www.doi.org/10.1007/s12257-018-0497-9>
23. Cheng, S. Orthogonal Engineering of Biosynthetic Pathway for Efficient Production of Limonene in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Cheng, X. Liu, G. Jiang, J. Wu, J. L. Zhang, D. Lei, Y.-J. Yuan, J. Qiao, G. R. Zhao // *ACS Synth Biol.* – 2019. – V. 8(5). – P. 968-975. <https://www.doi.org/10.1021/acssynbio.9b00135>
24. Coelho, M. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse / M. Coelho, P. F. F. Amaral, I. Belo // *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* – 2010. – V. 2. – P. 930-940.
25. Coussement, P. Direct Combinatorial Pathway Optimization / P. Coussement, D. Bauwens, J. Maertens, M. De Mey // *ACS Synth Biol.* – 2017. – V. 6(2). – P. 224-232. <https://www.doi.org/10.1021/acssynbio.6b00122>
26. Coutinho, T. A. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen / T. A. Coutinho, S. N. Venter // *Mol Plant Pathol.* – 2009. – V. 10(3). – P. 325-335. <https://www.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00542.x>
27. Cui, Z. A CRISPR/Cas9-Mediated, Homology-Independent Tool Developed for Targeted Genome Integration in *Yarrowia lipolytica* / Z. Cui, H. Zheng, J. Zhang, Z. Jiang, Z. Zhu, X. Liu, Q. Qi, J. Hou // *Appl Environ Microbiol.* – 2021. – V. 87(6). e02666-20. <https://www.doi.org/10.1128/AEM.02666-20>
28. Darvishi, F. Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals / F. Darvishi, M. Ariana, E. R. Marella, I. Borodina // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2018. – V. 102(14). – P. 5925-5938. <https://www.doi.org/10.1007/s00253-018-9099-x>

29. Davinelli, S. Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review / S. Davinelli, M. E. Nielsen, G. Scapagnini // *Nutrients*. – 2018. – V. 10(4). – P. 522-533
<https://www.doi.org/10.3390/nu10040522>
30. Ding, J. Bifunctional utilization of whey powder as a substrate and inducer for beta-farnesene production in an engineered *Escherichia coli* / J. Ding, Sh. You, W. Ba, H. Zhang, H. Chang, W. Qi, R. Su, Zh. He // *Bioresour Technol.* – 2021. – V. 341. – P. 125739.
<https://www.doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125739>
31. Dissook, S. Stable isotope and chemical inhibition analyses suggested the existence of a non-mevalonate-like pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* / S. Dissook, T. Kuzuyama, Y. Nishimoto, S. Kitani, S. Putri, E. Fukusaki // *Sci Rep.* – 2021. – V. 11(1). – P. 5598-5607.
<https://www.doi.org/10.1038/s41598-021-85170-0>
32. Dujon, B. Genome evolution in yeasts / B. Dujon, D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. de Montigny, Ch. Marck, Ce'cile Neuve'glise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J.-M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. de Daruvar, L. Despons, E. Fabre, Ce'cile Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, Ch. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J.-M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G.-F. Richard, M.-L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaiia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, Ch. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, J.-L. Souciet // *Nature*. – 2004. – V. 430(6995). – P. 35-44. <https://www.doi.org/10.1038/nature02579>
33. Dusseaux, S. Transforming yeast peroxisomes into microfactories for the efficient production of high-value isoprenoids / S. Dusseaux, W. T. Wajn, Y. Liu, C. Ignea, S. C. Kampranis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2020. – V. 117(50). – P. 31789-31799.
<https://www.doi.org/10.1073/pnas.2013968117>
34. Eguchi, Y. Estimating the protein burden limit of yeast cells by measuring the expression limits of glycolytic proteins / Y. Eguchi, K. Makanae, T. Hasunuma, Y. Ishibashi, K. Kito, H. Moriya // *Elife*. – 2018. – V. 7. – e34595. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.34595>
35. FDA U. S. Food and drug administration. Sec. 184.1245 Beta-carotene. [Electronic resource]. – CFR - Code of Federal Regulations. – Title 21. – V. 3. CITE: 21CFR184.1245.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1245>
36. Fickers, P. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications / P. Fickers, P. H. Benetti, Y. Wache, A. Marty, S. Mauersberger, M. S. Smit, J. M.

- Nicaud // FEMS Yeast Res. – 2005. – V. 5(6-7). – P. 527-543.
<https://www.doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
37. Fickers, P. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica* / P. Fickers, M. T. Le Dall, C. Gaillardin, P. Thonart, J. M. Nicaud // J Microbiol Methods. – 2003. – V. 55(3). – P. 727-737.
<https://www.doi.org/10.1016/j.mimet.2003.07.003>
38. Fischer, M. J. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast / M. J Fischer, S. Meyer, P. Claudel, M. Bergdoll, F. Karst // Biotechnol Bioeng. – 2011. – V. 108(8). – P 1883-1892.
<https://www.doi.org/10.1002/bit.23129>
39. Fujihashi, M. Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase / M. Fujihashi, Y. W. Zhang, Y. Higuchi, X. Y. Li, T. Koyama, K. Miki // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2001. – V. 98(8). – P 4337-4342.
<https://www.doi.org/10.1073/pnas.071514398>
40. Fuller, R. W. A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines / R. W. Fuller, J. H. 2nd Cardellina, Y. Kato, L. S. Brinen, J. Clardy, K. M. Snader, M. R. Boyd // J Med Chem. – 1992. – V. 35(16). – P 3007-3011. <https://www.doi.org/10.1021/jm00094a012>
41. Gao, S. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous beta-carotene production. / Sh. Gao, Y. Tong, L. Zhu, M. Ge, Y. Zhang, D. Chen, Y. Jiang, Sh. Yang // Metab Eng. – 2017. – V. 41. – P 192-201.
<https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2017.04.004>
42. Gibson, D. G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments / D. G. Gibson // Methods Enzymol. – 2011. – V498. P 349-361. <https://www.doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2>
43. Gibson, D. G. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases / D. G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison 3rd, H. O. Smith // Nat Methods. – 2009. – V. 6(5). – P 343-345. <https://www.doi.org/10.1038/nmeth.1318>
44. Green, M. R. Molecular cloning. A Laboratory Manual 4th. / M. R. Green, J. Sambrook // Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. – 2012.
45. Grenfell-Lee, D. The safety of b-carotene from *Yarrowia lipolytica* / D. Grenfell-Lee, S. Zeller, R. Cardoso, K. Pucaj // Food Chem Toxicol. – 2014. – V. 65. – P 1-11,
<https://www.doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.010>

46. Gross, G. J. Acute and chronic administration of disodium disuccinate astaxanthin (Cardax) produces marked cardioprotection in dog hearts / G. J. Gross, S. F. Lockwood // *Mol Cell Biochem.* – 2005. – V. 272(1-2). – P 221-227. <https://www.doi.org/10.1007/s11010-005-7555-2>
47. Guneser, O. Production of flavor compounds from olive mill waste by *Rhizopus oryzae* and *Candida tropicalis* / O. Guneser, A. Demirkol, Y. K. Yuceer, S. O. Togay, M. I. Hosoglu, M. Elibol // *Braz J Microbiol.* – 2017. – V. 48(2). – P 275-285. <https://www.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.003>
48. Guo, J. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts / J. Guo, Y. J. Zhou, M. L. Hillwig, Y. Shen, L. Yang, Y. Wang, X. Zhang, W. Liu, R. J. Peters, X. Chen, Z. K. Zhao, L. Huang // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – V. 110(29). – P 12108-12113. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.1218061110>
49. Guo, X. Heterologous biosynthesis of (+)-nootkatone in unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* / X. Guo, J. Sun, D. Li, W. Lu // *Biochemical Engineering Journal.* – 2018. – V. 137. – P 125-131. <https://www.doi.org/10.1016/j.bej.2018.05.023>
50. Han, C. Enhanced mating-type switching and sexual hybridization in heterothallic yeast *Yarrowia lipolytica*. / Ch. Han, H. Kwon, G. Park, M. Jang, H.-J. Lee, S. Seo, M. Kwon, W. Jeon, H. Lee, H. Lee, J. Ahn // *FEMS Yeast Res.* – 2020. – V. 20(2). – foaa011. <https://www.doi.org/10.1093/femsyr/foaa011>
51. Hapeta, P. The Role of Hexokinase and Hexose Transporters in Preferential Use of Glucose over Fructose and Downstream Metabolic Pathways in the Yeast *Yarrowia lipolytica* / P. Hapeta, P. Szczepanska, T. Witkowski, J. M. Nicaud, A. M. Crutz-Le Coq, Z. Lazar // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22(17). – P. 9282 <https://www.doi.org/10.3390/ijms22179282>
52. Haque, Md. I. IN-SILICO MOLECULAR DOCKING STUDY OF LINALOOL AGAINST 3ELJ FOR CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS IN HEPG2 CELLS. / Md. I. Haque, A. B. R. Khalipha, M.R. Sakib, A. A. Sh. Prottay, Md. A. Islam, R. Zannat, S. Sardar, N. Z. Santa // *International Journal of Evergreen Scientific Research Research Paper.* – 2021. – V. 3(02). – P. 105-118.
53. Higuera-Ciapara, I. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications / I. Higuera-Ciapara, L. Felix-Valenzuela, F. M. Goycoolea // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2006. – V. 46(2). – P. 185-196. <https://www.doi.org/10.1080/10408690590957188>
54. Holkenbrink, C. EasyCloneYALI: CRISPR/Cas9-Based Synthetic Toolbox for Engineering of the Yeast *Yarrowia lipolytica* / C. Holkenbrink, M. I. Dam, K. R. Kildegaard, J. Beder, J. Dahlin, D. Domenech Belda, I. Borodina // *Biotechnol J.* – 2018. – V. 13(9). e1700543. <https://www.doi.org/10.1002/biot.201700543>

55. Hoshino, Y. Stereospecific linalool production utilizing two-phase cultivation system in *Pantoea ananatis* / Y. Hoshino, M. Moriya, A. Matsudaira, J. I. Katashkina, N. Nitta, Y. Nishio, Y. Usuda // J Biotechnol. – 2020. – V. 324. – P. 21-27. <https://www.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.021>
56. Hu, T. Engineering chimeric diterpene synthases and isoprenoid biosynthetic pathways enables high-level production of miltiradiene in yeast / T. Hu, J. Zhou, Y. Tong, P. Su, X. Li, Y. Liu, N. Liu, X. Wu, Y. Zhang, J. Wang, L. Gao, L. Tu, Y. Lu, Zh. Jiang, Y. J. Zhou, W. Gao, L. Huang // Metab Eng. – 2020. – V. 60. – P. 87-96. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2020.03.011>
57. Ignea, C. Engineering monoterpene production in yeast using a synthetic dominant negative geranyl diphosphate synthase / C. Ignea, M. Pontini, M. E. Maffei, A. M. Makris, S. C. Kampranis // ACS Synth Biol. – 2014. – V. 3(5). – P. 298-306. <https://www.doi.org/10.1021/sb400115e>
58. Ji, Q. Improving the homologous recombination efficiency of *Yarrowia lipolytica* by grafting heterologous component from *Saccharomyces cerevisiae* / Q. Ji, J. Mai, Y. Ding, Y. Wei, R. Ledesma-Amaro, X. J. Ji // Metab Eng Commun. – 2020. – V. 11. – e00152. <https://www.doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00152>
59. Jia, D. *Yarrowia lipolytica* construction for heterologous synthesis of alpha-santalene and fermentation optimization / D. Jia, S. Xu, J. Sun, C. Zhang, D. Li, W. Lu // Appl Microbiol Biotechnol. – 2019. – V. 103(8). – P. 3511-3520. <https://www.doi.org/10.1007/s00253-019-09735-w>
60. Jiang, G. Z. Manipulation of *GES* and *ERG20* for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* / G.-Zh. Jiang, M.-D. Yao, Y. Wang, L. Zhou, T.-Q. Song, H. Liu, W.-H. Xiao, Y.-J. Yuan // Metab Eng. – 2017. – V. 41. – P. 57-66. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2017.03.005>
61. Jin, C. C. Boosting the biosynthesis of betulinic acid and related triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* via multimodular metabolic engineering / C. C. Jin, J. L. Zhang, H. Song, Y. X. Cao // Microb Cell Fact. – 2019. – V.18(1). – P. 77. <https://www.doi.org/10.1186/s12934-019-1127-8>
62. Jongedijk, E. Biotechnological production of limonene in microorganisms / E. Jongedijk, K. Cankar, M. Buchhaupt, J. Schrader, H. Bouwmeester, J. Beekwilder // Appl Microbiol Biotechnol. – 2016. – V.100(7). – P. 2927-2938. <https://www.doi.org/10.1007/s00253-016-7337-7>
63. Jorda, T. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*/ T. Jorda, S. Puig // Genes (Basel). – 2020. – V. 11(7). – P. 795. <https://www.doi.org/10.3390/genes11070795>

64. Kamatou, G. P. Linalool – a Review of a Biologically Active Compound of Commercial Importance / G. P. Kamatou, A. Viljoen // *Natural Product Communications*. – 2008. – V. 3. – P. 1183-1192. <https://www.doi.org/10.1177/1934578X0800300727>
65. Kamineneni, A. Promoters for lipogenesis-specific downregulation in *Yarrowia lipolytica* / A. Kamineneni, S. Chen, G. Chifamba, V. Tsakraklides // *FEMS Yeast Res.* – 2020. – V. 20(5). <https://www.doi.org/10.1093/femsyr/foaa035>
66. Kang, W., Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux / W. Kang, T. Ma, M. Liu, J. Qu, Zh. Liu, H. Zhang, B. Shi, Sh. Fu, J. Ma, L. T. F. Lai, S. He, J. Qu, Sh. W.-N. Au, B. H. Kang, W. C. Y. Lau, Z. Deng, Ji. Xia, T. Liu // *Nat Commun.* – 2019. – V. 10(1). – P. 4248. <https://www.doi.org/10.1038/s41467-019-12247-w>
67. Kastberg, L. L. B. Burden Imposed by Heterologous Protein Production in Two Major Industrial Yeast Cell Factories: Identifying Sources and Mitigation Strategies / L. L. B. Kastberg, R. Ard, M. K. Jensen, C. T. Workman // *Frontiers in Fungal Biology*. – 2022. – V. 3. – P. 827704. <https://www.doi.org/10.3389/ffunb.2022.827704>
68. Kildegaard, K. R. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin / K. R. Kildegaard, B. Adiego-Perez, D. Domenech Belda, J. K. Khangura, C. Holkenbrink, I. Borodina // *Synth Syst Biotechnol.* – 2017. – V. 2(4). – P. 287-294. <https://www.doi.org/10.1016/j.synbio.2017.10.002>
69. Kohandel, Z. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases / Z. Kohandel, T. Farkhondeh, M. Aschner, A. M. Pourbagher-Shahri, S. Samarghandian // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – V. 145. – P. 112179. <https://www.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112179>
70. Kumar, S. Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential / S. Kumar, R. Kumar, Diksha, A. Kumari, A. Panwar // *J Basic Microbiol.* – 2022. – V. 62(9). – P. 1064-1082. <https://www.doi.org/10.1002/jobm.202100391>
71. Labun, K. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering / K. Labun, T. G. Montague, J. A. Gagnon, S. B. Thyme, E. Valen // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44(W1). – P. W272-276. <https://www.doi.org/10.1093/nar/gkw398>
72. Larroude, M. A. synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of beta-carotene / M. Larroude, E. Celinska, A. Back, S. Thomas, J. M. Nicaud, R. Ledesma-Amaro // *Biotechnol Bioeng.* – 2018. – V. 115(2). – P. 464-472. <https://www.doi.org/10.1002/bit.26473>

73. Larroude, M. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica* / M. Larroude, T. Rossignol, J. M. Nicaud, R. Ledesma-Amaro // *Biotechnol Adv.* – 2018. – V. 36(8). – P. 2150-2164. <https://www.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.004>
74. Lazar, Z. Hexokinase-A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica* / Z. Lazar, T. Dulermo, C. Neueglise, A. M. Crutz-Le Coq, J. M. Nicaud // *Metab Eng.* – 2014. – V. 26. – P. 89-99. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.09.008>
75. Lazar, Z. Characterization of hexose transporters in *Yarrowia lipolytica* reveals new groups of Sugar Porters involved in yeast growth / Z. Lazar, C. Neuvégilise, T. Rossignol, H. Devillers, N. Morin, M. Robak, J.-M. Nicaud, A.-M. Crutz-Le Coq // *Fungal Genet Biol.* – 2017. – V. 100. – P. 1-12. <https://www.doi.org/10.1016/j.fgb.2017.01.001>
76. Ledesma-Amaro, R. Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica* / R. Ledesma-Amaro, J. M. Nicaud // *Trends Biotechnol.* – 2016. – V. 34(10). – P. 798-809. <https://www.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>
77. Li, D., Li, Y. Engineering *CrtW* and *CrtZ* for improving biosynthesis of astaxanthin in *Escherichia coli* / D. Li, Y. Li, J.-Y. Xu, Q.-Y. Li, J.-L. Tang, Sh.-R. Jia, C.-H. Bi, Zhu-Bo Dai, X.-N. Zhu, X.-L. Zhang // *Chin J Nat Med.* – 2020. – V. 18(9). – P. 666-676. [https://www.doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)60005-X](https://www.doi.org/10.1016/S1875-5364(20)60005-X)
78. Li, D., Wu, Y. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for heterologous oleanolic acid production / D. Li, Y. Wu, P. Wei, X. Gao, M. Li, Ch. Zhang, Zh. Zhou, W. Lu // *Chemical Engineering Science.* – 2020. – V. 218. – P. 115529. <https://www.doi.org/10.1016/j.ces.2020.115529>
79. Li, D., Wu, Y. Production of Triterpene Ginsenoside Compound K in the Non-conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* / D. Li, Y. Wu, C. Zhang, J. Sun, Z. Zhou, W. Lu // *J Agric Food Chem.* – 2019. – V. 67(9). – P. 2581-2588. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00009>
80. Li, J. Simultaneous Improvement of Limonene Production and Tolerance in *Yarrowia lipolytica* through Tolerance Engineering and Evolutionary Engineering / J. Li, K. Zhu, L. Miao, L. Rong, Y. Zhao, Sh. Li, L. Ma, J. Li, C. Zhang, D. Xiao, J. L. Foo, A. Yu // *ACS Synth Biol.* – 2021. – V. 10(4). – P. 884-896. <https://www.doi.org/10.1021/acssynbio.1c00052>
81. Li, M. Spatiotemporal Regulation of Astaxanthin Synthesis in *S. cerevisiae* / M. Li, P. Zhou, M. Chen, H. Yu, L. Ye // *ACS Synth Biol.* – 2022. – V. 11(8). – P. 2636-2649. <https://www.doi.org/10.1021/acssynbio.2c00044>
82. Li, T. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* To Overproduce Squalene / T. Li, G.-S. Liu, W. Zhou, M. Jiang, Y.-H. Ren, X.-Y. Tao, M. Liu, M. Zhao, F.-Q. Wang, B. Gao, D.-Zh. Wei // *J Agric Food Chem.* – 2020. – V. 68(7). – P. 2132-2138. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07419>

83. Li, Y. W. YALIcloneNHEJ: An Efficient Modular Cloning Toolkit for NHEJ Integration of Multigene Pathway and Terpenoid Production in *Yarrowia lipolytica* / Y.-W. Li, C.-L. Yang, Q. Shen, Q.-Q. Peng, Q. Guo, Zh.-K. Nie, X.-M. Sun, T.-Q. Shi, X.-J. Ji, H. Huang // Front Bioeng Biotechnol. – 2021. – V. 9. – P. 816980. <https://www.doi.org/10.3389/fbioe.2021.816980>
84. Li, Z. J. Advanced Strategies for the Synthesis of Terpenoids in *Yarrowia lipolytica* / Z. J. Li, Y. Z. Wang, L. R. Wang, T. Q. Shi, X. M. Sun, H. Huang // J Agric Food Chem. - 2021. – V. 69(8). – P. 2367-2381. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00350>
85. Liu, M. Morphological and Metabolic Engineering of *Yarrowia lipolytica* to Increase beta-Carotene Production / M. Liu, J. Zhang, J. Ye, Q. Qi, J. Hou // ACS Synth Biol. – 2021. – V. 10(12). – P. 3551-3560. <https://www.doi.org/10.1021/acssynbio.1c00480>
86. Liu, X. Stereoisomers of Astaxanthin Inhibit Human Colon Cancer Cell Growth by Inducing G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis / X. Liu, M. Song, Z. Gao, X. Cai, W. Dixon, X. Chen, Y. Cao, H. Xiao // J Agric Food Chem. – 2016. – V. 64(41). – P. 7750-7759. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03636>
87. Liu, Y. α -Farnesene production from lipid by engineered *Yarrowia lipolytica* / Y. Liu, Z. Wang, Z. Cui, Q. Qi, J. Hou // Bioresources and Bioprocessing. – 2021. – V. 8. <https://www.doi.org/10.1186/s40643-021-00431-0>
88. Ma, T. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene / T. Ma, B. Shi, Z. Ye, X. Li, M. Liu, Y. Chen, J. Xia, J. Nielsen, Z. Deng, T. Liu // Metab Eng. – 2019. – V. 52. – P. 134-142. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2018.11.009>
89. Ma, Y., Li, J. Targeting pathway expression to subcellular organelles improves astaxanthin synthesis in *Yarrowia lipolytica* / Y. Ma, J. Li, S. Huang, G. Stephanopoulos // Metab Eng. – 2021. – V. 68. – P. 152-161. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2021.10.004>
90. Ma, Y., Li, W. Engineering *Yarrowia lipolytica* for sustainable production of the chamomile sesquiterpene (-)- α -bisabolol / Y. Ma, W. Li, J. Mai, J. Wang, Y. Wei, R. Ledesma-Amaro, X.-J. Ji // Green Chemistry. – 2021. – V. 23(2). – P. 780-787. <https://www.doi.org/10.1039/D0GC03180A>
91. Ma, Y. Removal of lycopene substrate inhibition enables high carotenoid productivity in *Yarrowia lipolytica* / Y. Ma, N. Liu, P. Greisen, J. Li, K. Qiao, S. Huang, G. Stephanopoulos // Nat Commun. – 2022. – V. 13(1). – P. 572. <https://www.doi.org/10.1038/s41467-022-28277-w>
92. Maass, D. Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels / D. Maass, J. Arango, F. Wust, P. Beyer, R. Welsch // PLoS One. – 2009. – V. 4(7). – e6373. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0006373>

93. Maczka, W. One Hundred Faces of Geraniol / W. Maczka, K. Winska, M. Grabarczyk // *Molecules*. – 2020. – V. 25(14). <https://www.doi.org/10.3390/molecules25143303>
94. Madzak, C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering / C. Madzak // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2015. – V. 99(11). – P. 4559-4577. <https://www.doi.org/10.1007/s00253-015-6624-z>
95. Madzak, C. *Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications: How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement / C. Madzak // *J Fungi (Basel)*. – 2021. – V. 7(7). <https://www.doi.org/10.3390/jof7070548>
96. Madzak, C. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica* / C. Madzak, B. Treton, S. Blanchin-Roland // *J Mol Microbiol Biotechnol*. – 2000. – V. 2(2). – P. 207-216.
97. Mai, J. Engineering Plant Sesquiterpene Synthesis into Yeasts: A Review / J. Mai, W. Li, R. Ledesma-Amaro, X. J. Ji // *J Agric Food Chem*. – 2021 – V. 69(33). – P. 9498-9510. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03864>
98. Maimone, T. J. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes / T. J. Maimone, P. S. Baran // *Nat Chem Biol*. – 2007. – V. 3(7). – P. 396-407. <https://www.doi.org/10.1038/nchembio.2007.1>
99. Marsafari, M. Debottlenecking mevalonate pathway for antimalarial drug precursor amorphanthene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* / M. Marsafari, P. Xu // *Metab Eng Commun*. – 2020. – V. 10. – e00121. <https://www.doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00121>
100. Martin, J. F. Conversion of beta-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? / J. F. Martin, E. Gudina, J. L. Barredo // *Microb Cell Fact*. – 2008. – V. 7. – P. 3. <https://www.doi.org/10.1186/1475-2859-7-3>
101. Matthaus, F. Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica* / F. Matthaus, M. Ketelhot, M. Gatter, G. Barth // *Appl Environ Microbiol*. – 2014. – V. 80(5). – P. 1660-1669. <https://www.doi.org/10.1128/AEM.03167-13>
102. Meadows, A. L. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production / A. L. Meadows, K. M. Hawkins, Y. Tsegaye, E. Antipov, Y. Kim, L. Raetz, R. H. Dahl, A. Tai, T. Mahatdejkul-Meadows, L. Xu, L. Zhao, M. S. Dasika, A. Murarka, J. Lenihan, D. Eng, J. S. Leng, Ch.-L. Liu, J.W. Wenger, H. Jiang, L. Chao, P. Westfall, J. Lai, S. Ganesan, P. Jackson, R. Mans, D. Platt, Ch. D. Reeves, P. R. Sajja, G. Wichmann, V. F. Holmes, K. Benjamin, P. W. Hill, T. S. Gardner, A. E. Tsong // *Nature*. – 2016. – V. 537(7622). – P. 694-697. <https://www.doi.org/10.1038/nature19769>
103. Meng, Y. Extension of cell membrane boosting squalene production in the engineered *Escherichia coli* / Yu. Meng, X. Shao, Y. Wang, Yu. Li, X. Zheng, G. Wei, S.-W. Kim, Ch.

- Wang // *Biotechnol Bioeng.* – 2020. – V. 117(11). – P. 3499-3507.
<https://www.doi.org/10.1002/bit.27511>
104. Miller, K. K. *Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse / K. K. Miller, H. S. Alper // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2019. – V. 103(23-24). – P. 9251-9262.
<https://www.doi.org/10.1007/s00253-019-10200-x>
105. Moeller, L. Substrate utilization by recombinant *Yarrowia lipolytica* growing on sucrose / L. Moeller, A. Zehnsdorf, A. Aurich, T. Bley, B. Strehlitz // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – V. 93(4). – P. 1695-1702. <https://www.doi.org/10.1007/s00253-011-3681-9>
106. Mohandesi, N. Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* *SUC2* gene in yeast platform and characterization of recombinant enzyme biochemical properties / N. Mohandesi, S. O. Siadat, K. Haghbeen, A. Hesampour // *3 Biotech.* – 2016. – V. 6(2). – P. 129.
<https://www.doi.org/10.1007/s13205-016-0441-7>
107. Moldowan, J. M. Head-to-Head Linked Isoprenoid Hydrocarbons in Petroleum / J. M. Moldowan, W. K. Seifert // *Science.* – 1979. – V. 204(4389). – P. 169-171.
<https://www.doi.org/10.1126/science.204.4389.169>
108. Moretti, V. M. Determination of astaxanthin stereoisomers and colour attributes in flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to distinguish the dietary pigmentation source / V. M. Moretti, T. Mentasti, F. Bellagamba, U. Luzzana, F. Caprino, G. M. Turchini, I. Giani, F. Valfrè // *Food Addit Contam.* – 2006. – V. 23(11). – P. 1056-1063.
<https://www.doi.org/10.1080/02652030600838399>
109. Nitta, N. Fermentative production of enantiopure (S)-linalool using a metabolically engineered *Pantoea ananatis* / N. Nitta, Y. Tajima, Y. Yamamoto, M. Moriya, A. Matsudaira, Y. Hoshino, Y. Nishio, Y. Usuda // *Microb Cell Fact.* – 2021. – V. 20(1). – P. 54.
<https://www.doi.org/10.1186/s12934-021-01543-0>
110. Niu, F. X., Enhancing Production of Pinene in *Escherichia coli* by Using a Combination of Tolerance, Evolution, and Modular Co-culture Engineering / F. X. Niu, X. He, Y. Q. Wu, J. Z. Liu // *Front Microbiol.* – 2018. – V. 9. – P. 1623.
<https://www.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01623>
111. Ozek, T. Enantiomeric Distribution of Some Linalool Containing Essential Oils and Their Biological Activities / T. Ozek, N. Tabanca, F. Demirci, D. Wedge, K. H. C. Baser // *Records of Natural Products.* – 2010. – V. 4. – P. 180-192.
112. Pang, Y. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil / Y. Pang, Y. Zhao, Sh. Li, Y. Zhao, J. Li, Zh. Hu, C. Zhang, D. Xiao, A. Yu // *Biotechnol Biofuels.* – 2019. – V. 12. – P. 241. <https://www.doi.org/10.1186/s13068-019-1580-y>

113. Panis, G. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line / G. Panis, J. Rosales Carreón // *Algal Research*. – 2016. – V. 18. – P. 175-190. <https://www.doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>
114. Park, Y. Altered Lipid Synthesis by Lack of Yeast Pah1 Phosphatidate Phosphatase Reduces Chronological Life Span / Y. Park, G. S. Han, E. Mileykovskaya, T. A. Garrett, G. M. Carman // *J Biol Chem*. – 2015. – V. 290(42). – P. 25382-25394. <https://www.doi.org/10.1074/jbc.M115.680314>
115. Park, Y. K. Engineering the architecture of erythritol-inducible promoters for regulated and enhanced gene expression in *Yarrowia lipolytica*. / Y.-K. Park, P. Korpys, M. Kubiak, E. Celinska, P. Soudier, P. Trébulle, M. Larroude, T. Rossignol, J.-M. Nicaud // *FEMS Yeast Res*. – 2019. – V. 19(1). <https://www.doi.org/10.1093/femsyr/foy105>
116. Patel, A. K. Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review / A. K. Patel, V. S. Tambat, Ch.-W. Chen, A. S. Chauhan, P. Kumar, A. P. Vadrade, Ch.-Yu. Huang, Ch.-D. Dong, R. R. Singhania // *Bioresour Technol*. – 2022. – V. 364. – P. 128030. <https://www.doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128030>
117. Patil, A. D. Pharmaceutical and nutraceutical potential of natural bioactive pigment: astaxanthin / A. D. Patil, P. J. Kasabe, P. B. Dandge // *Nat Prod Bioprospect*. – 2022. – V. 12(1). – P. 25. <https://www.doi.org/10.1007/s13659-022-00347-y>
118. Pereira, I. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems / I. Pereira, P. Severino, A. C. Santos, A. M. Silva, E. B. Souto // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2018. – V. 171. – P. 566-578. <https://www.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.001>
119. Pomraning, K. R. Draft Genome Sequence of the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica* Strain W29 / K. R. Pomraning, S. E. Baker // *Genome Announc*. – 2015. – V. 3(6). <https://www.doi.org/10.1128/genomeA.01211-15>
120. Rai, A. Heteromeric and homomeric geranyl diphosphate synthases from *Catharanthus roseus* and their role in monoterpene indole alkaloid biosynthesis / A. Rai, S. S. Smita, A. K. Singh, K. Shanker, D. A. Nagegowda // *Mol Plant*. – 2013. – V. 6(5). – P. 1531-1549. <https://www.doi.org/10.1093/mp/sst058>
121. Ren, Y. Carotenoid Production from Microalgae: Biosynthesis, Salinity Responses and Novel Biotechnologies. / Y. Ren, H. Sun, J. Deng, J. Huang, F. Chen // *Mar Drugs*. – 2021. – V. 19(12). <https://www.doi.org/10.3390/md19120713>

122. Rodrigues, G. The Influence of Acetic and Other Weak Carboxylic Acids on Growth and Cellular Death of the Yeast *Yarrowia lipolytica* / G. Rodrigues, C. Pais // Food Technology and Biotechnology. – 2000. – V. 12. – P. 579-1006.
123. Rolf, J. A. Gram-Scale Limonene Production Process with Engineered *Escherichia coli* / J. Rolf, M. K. Julsing, K. Rosenthal, S. Lutz // Molecules. – 2020. – V. 25(8). <https://www.doi.org/10.3390/molecules25081881>
124. Saini, R. K. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments / R. K. Saini, Y. S. Keum // Food Chem. – 2018. – V. 240. – P. 90-103. <https://www.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
125. Scaife, M. A. Progress toward an *Escherichia coli* canthaxanthin bioprocess / M. A. Scaife, C. A. Prince, A. Norman, R. E. Armenta // Process Biochemistry. – 2012. – V. 47(12). – P. 2500-2509. <https://www.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.10.012>
126. Schillmiller, A. L. Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate / A. L. Schillmiller, I. Schauvinhold, M. Larson, R. Xu, A. L. Charbonneau, A. Schmidt, C. Wilkerson, R. L. Last, E. Pichersky // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – V. 106(26). – P. 10865-10870. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.0904113106>
127. Schwartz, C. Standardized Markerless Gene Integration for Pathway Engineering in *Yarrowia lipolytica* / C. Schwartz, M. Shabbir-Hussain, K. Frogue, M. Blenner, I. Wheeldon // ACS Synth Biol. – 2017. – V. 6(3). – P. 402-409. <https://www.doi.org/10.1021/acssynbio.6b00285>
128. Shao, Y. Crystallization of alpha- and beta-carotene in the foregut of *Spodoptera* larvae feeding on a toxic food plant / Y. Shao, D. Spiteller, X. Tang, L. Ping, C. Colesie, U. Münchberg, S. Bartram, B. Schneider, B. Büdel, J. Popp, D. G. Heckel, W. Boland // Insect Biochem Mol Biol. – 2011. – V. 41(4). – P. 273-281. <https://www.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.01.004>
129. Shi, T. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for beta-farnesene overproduction / T. Shi, Y. Li, L. Zhu, Y.g Tong, J. Yang, Yu. Fang, M. Wang, J. Zhang, Yu Jiang, Sh. Yang // Biotechnol J. – 2021. – V. 16(7). e2100097. <https://www.doi.org/10.1002/biot.202100097>
130. Siahaan, E. A. Beneficial effects of astaxanthin in cosmeceuticals with focus on emerging market trends / E. A. Siahaan, R. Pangestuti, I. S. Pratama, Y. Putra, S.-K. Kim // In G. A. Ravishankar, A. Ranga Rao (Eds.) Global Perspectives on Astaxanthin : Academic Press. – 2021. – Chapter 27 . – P. 557-568. <https://www.doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00015-5>

131. Sibirny, A. Genetic engineering of nonconventional yeasts for the production of valuable compounds/ A. Sibirny, C. Madzak, F. Patrick // Microbial Biotechnology. 1st Edition. CRC Press. – 2015. – P. 50 <https://www.doi.org/10.1201/9781351228701-9>
132. Soong, Y. V. Cellular and metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for bioconversion of hydrophobic substrates into high-value products / Y. V. Soong, N. Liu, S. Yoon, C. Lawton, D. Xie // Eng Life Sci. – 2019. – V. 19(6). – P. 423-443. <https://www.doi.org/10.1002/elsc.201800147>
133. Soulmani, R. Toxicological aspects and pharmaco-therapeutic properties of linalool, a natural terpene derivative of essential oils: Literature studies / R. Soulmani, R. K. Joshi // Am J Essent Oil Nat Prod. – 2020. – V. 8(4). – P. 24-34.
134. Spagnuolo, M. Alternative Substrate Metabolism in *Yarrowia lipolytica* / M. Spagnuolo, M. Shabbir Hussain, L. Gambill, M. Blenner, // Front Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 1077. <https://www.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01077>
135. Stachowiak, B. Astaxanthin for the Food Industry / B. Stachowiak, P. Szulc // Molecules. 2021. – V. 26(9). – P. 2666. <https://www.doi.org/10.3390/molecules26092666>
136. Sun, L. High-level beta-carotene production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without overexpression of a truncated HMG1 (tHMG1) / L. Sun, C. A. Atkinson, Y. G. Lee, Y. S. Jin // Biotechnol Bioeng. – 2020. – V. 117(11). – P. 3522-3532. <https://www.doi.org/10.1002/bit.27508>
137. Sun, M. L. Advancing *Yarrowia lipolytica* as a superior biomanufacturing platform by tuning gene expression using promoter engineering / M. L. Sun, T. Q. Shi, L. Lin, R. Ledesma-Amaro, X. J. Ji // Bioresour Technol. – 2022. – V. 347. – P. 126717. <https://www.doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126717>
138. Tai, M. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production / M. Tai, G. Stephanopoulos // Metab Eng. – 2013. – V. 15. P. 1-9. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.007>
139. Tang, W. Y. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for improving squalene production / W.-Y. Tang, D.-P. Wang, Yu. Tian, X. Fan, Ch. Wang, X.-Y. Lu, P.-W. Li, X.-J. Ji, H.-H. Liu // Bioresour Technol. – 2021. – V. 323. P. 124652. <https://www.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124652>
140. Tappin, M. Synthesis of the Prospective Anticancer Molecule Perillic Acid from Orange Essential Oil by the Yeast *Yarrowia lipolytica* / M. Tappin, F. Knopp, I. Cardoso, R. Santos, B. Drummond, A. Siani, E. Bon, M. Ferrara // Green and Sustainable Chemistry. – 2017. – V. 07. – P. 172-184. <https://www.doi.org/10.4236/gsc.2017.72013>

141. Taratynova, M. O. Accumulation of Neutral Lipids and β -Carotene by the *Yarrowia lipolytica* Yeast on a Medium with Sucrose as a Carbon Source / M.O. Taratynova, Y. M. Kosikhina, E.B. Vinogradova, D.A. Dementev, V.S. Korobov, V.A. Zolottsev, T.V. Yuzbashev, E.Y. Yuzbasheva, S.P. Sineoky // *Biotechnology*. – 2021. – V. 37(3). – P. 29-41. <https://www.doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-3-29-41>
142. Taratynova, M. O. Boosting Geranyl Diphosphate Synthesis for Linalool Production in Engineered *Yarrowia lipolytica* / M. O. Taratynova, E. E. Tikhonova, Iu. M. Fedyaeva, D. A. Dementev, T. V. Yuzbashev, A. I. Solovyev, S. P. Sineoky, E. Y. Yuzbasheva // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2023. <https://www.doi.org/10.1007/s12010-023-04581-z>
143. Tetali, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use / S. D. Tetali // *Planta*. – 2019. – V. 249(1). – P. 1-8. <https://www.doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x>
144. Tramontin, L. R. R. Enhancement of Astaxanthin Biosynthesis in Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* via Microalgal Pathway. / L. R. R. Tramontin, K. R. Kildegaard, S. Sudarsan, I. Borodina // *Microorganisms*. – 2019. – V. 7(10). <https://www.doi.org/10.3390/microorganisms7100472>
145. Velayos, A. A. bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides* / A. Velayos, A. P. Eslava, E. A. Iturriaga // *Eur J Biochem*. – 2000. – V. 267(17). – P. 5509-5519. <https://www.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01612.x>
146. Verbeke, J. Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in *Ku70* deficient *Yarrowia lipolytica* strains / J. Verbeke, A. Beopoulos, J. M. Nicaud // *Biotechnol Lett*. – 2013. – V. 35(4). – P. 571-576. <https://www.doi.org/10.1007/s10529-012-1107-0>
147. Verduyn, C. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation / C. Verduyn, E. Postma, W. A. Scheffers, J. P. Van Dijken // *Yeast*. – 1992. – V. 8(7). – P. 501-517. <https://www.doi.org/10.1002/yea.320080703>
148. Wang, C. Characterization of the endogenous promoters in *Yarrowia lipolytica* for the biomanufacturing applications / C. Wang, M. Lin, Z. Yang, X. Lu, Y. Liu, H. Lu, J. Zhu, X. Sun, Y. Gu // *Process Biochemistry*. – 2023. – V. 124. – P. 245-252. <https://www.doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.023>
149. Wang, J. Overproduction of alpha-Farnesene in *Saccharomyces cerevisiae* by Farnesene Synthase Screening and Metabolic Engineering / J. Wang, W. Jiang, C. Liang, L. Zhu, Y. Li, Q. Mo, S. Xu, A. Chu, L. Zhang, Z. Ding, G. Shi // *J Agric Food Chem*. – 2021. – V. 69(10). – P. 3103-3113. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00008>

150. Wang, N. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for thermoresistance and enhanced erythritol productivity / N. Wang, P. Chi, Y. Zou, Y. Xu, S. Xu, M. Bilal, P. Fickers, H. Cheng // *Biotechnol Biofuels*. – 2020. – V. 13. – P. 176. <https://www.doi.org/10.1186/s13068-020-01815-8>
151. Wang, X. Efficient Biosynthesis of R-(-)-Linalool through Adjusting the Expression Strategy and Increasing GPP Supply in *Escherichia coli* / X. Wang, J. Wu, J. Chen, L. Xiao, Y. Zhang, F. Wang, X. Li // *J Agric Food Chem*. – 2020. – V. 68(31). – P. 8381-8390. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03664>
152. Wang, Z. Metabolic Engineering *Escherichia coli* for the Production of Lycopene / Z. Wang, J. Sun, Q. Yang, J. Yang // *Molecules*. – 2020. – V. 25(14). – P. 3136. <https://www.doi.org/10.3390/molecules25143136>
153. Wei, L. J. Biosynthesis of alpha-Pinene by Genetically Engineered *Yarrowia lipolytica* from Low-Cost Renewable Feedstocks / L. J. Wei, Y. T. Zhong, M. Y. Nie, S. C. Liu, Q. Hua // *J Agric Food Chem*. – 2021. – V. 69(1). – P. 275-285. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06504>
154. Wheeldon, I. *Yarrowia lipolytica*: Methods and Protocols / I. Wheeldon, M. Blenner // Humana press. – 2021. – V. 2307. <https://www.doi.org/10.1007/978-1-0716-1414-3>
155. Wolf, K. Nonconventional yeasts in biotechnology: a handbook / K. Wolf // Springer. – 1996.
156. Woolston, B. M. Metabolic engineering: past and future / B. M. Woolston, S. Edgar, G. Stephanopoulos // *Annu Rev Chem Biomol Eng*. – 2013. – V. 4. – P. 259-288. <https://www.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103312>
157. Wu, Y. Enhanced protopanaxadiol production from xylose by engineered *Yarrowia lipolytica* / Y. Wu, S. Xu, X. Gao, M. Li, D. Li, W. Lu // *Microb Cell Fact*. – 2019. – V. 18(1). – P. 83. <https://www.doi.org/10.1186/s12934-019-1136-7>
158. Xie, D. Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production / D. Xie, E. N. Jackson, Q. Zhu // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2015. – V. 99(4). – P. 1599-1610. <https://www.doi.org/10.1007/s00253-014-6318-y>
159. Xu, X. Pathway engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lycopene production / X. Xu, J. Liu, Y. Lu, H. Lan, L. Tian, Z. Zhang, C. Xie, L. Jiang // *Bioprocess Biosyst Eng*. – 2021. – V. 44(6). – P. 1033-1047. <https://www.doi.org/10.1007/s00449-020-02503-5>
160. Xue, Z. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* / Z. Xue, P. L. Sharpe, S.-P. Hong, N. S. Yadav, D. Xie, D. R. Short, H. G.

- Damude, R. A. Rupert, J. E. Seip, J. Wang, D. W. Pollak, M. W. Bostick, M. D. Bosak, D. J. Macool, D. H. Hollerbach, H. Zhang, D. M. Arcilla, S. A. Bledsoe, K. Croker, E. F. McCord, B. D. Tyreus, E. N. Jackson, Q. Zhu // *Nat Biotechnol.* – 2013. – V. 31(8). – P. 734-740. <https://www.doi.org/10.1038/nbt.2622>
161. Yabuzaki, J. Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms / J. Yabuzaki // *Database: The Journal of Biological Databases and Curation.* – 2017. – V. 2017. <https://www.doi.org/10.1093/database/bax004>
162. Yang, F. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production / F. Yang, M. A. Hanna, R. Sun // *Biotechnol Biofuels.* – 2012. – V. 5(13). <https://www.doi.org/10.1186/1754-6834-5-13>
163. Yang, J. Biosynthesis of beta-carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways / J. Yang, L. Guo // *Microb Cell Fact.* – 2014. – V. 13. – P. 160. <https://www.doi.org/10.1186/s12934-014-0160-x>
164. Yuzbashev, T. A DNA assembly toolkit to unlock the CRISPR/Cas9 potential for metabolic engineering / T. Yuzbashev, E. Yuzbasheva, O. Melkina, D. Patel, D. Bubnov, H. Dietz, R. Ledesma-Amaro // *Communications biology.* – 2023. – V. 6(1). – P. 858. <https://www.doi.org/10.1038/s42003-023-05202-5>
165. Yuzbasheva, E. Y. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: Its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid / E. Y. Yuzbasheva, G. Agrimi, T. V. Yuzbashev, P. Scarcia, E. B. Vinogradova, L. Palmieri, A. V. Shutov, Iu. M. Kosikhina, F. Palmieri, S. P. Sineoky // *Metab Eng.* – 2019. – V. 54. – P. 264-274. <https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.002>
166. Yuzbasheva, E. Y. Co-expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and acyl-CoA binding protein enhances lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* / E. Y. Yuzbasheva, E. B. Mostova, N. I. Andreeva, T. V. Yuzbashev, I. A. Laptev, T. I. Sobolevskaya, S. P. Sineoky // *N Biotechnol.* – 2017. – V. 39(Pt A). – P. 18-21. <https://www.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.008>
167. Yuzbasheva, E. Y. Large-scale bioproduction of natural astaxanthin in *Yarrowia lipolytica* / E. Y. Yuzbasheva, M. O. Taratynova, Iu. M. Fedyaeva, D. A. Dementev, V. S. Korobov, A. S. Fedorov, L. S. Vidal, T. V. Yuzbashev, S. P. Sineoky, M. Mikheev // *Bioresource Technology Reports.* – 2022. – V. 21. – P. 101289. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101289>
168. Yuzbasheva, E. Y. Method for increasing production of isocitric acid in yeast *Yarrowia lipolytica*, yeast of *Yarrowia lipolytica* type, capable of producing isocitric acid / E. Y. Yuzbasheva, E. Vinogradova, T. Yuzbashev, A. V. Shutov, Y. M. Kosikhina, G. Agrimi, F. Palmieri, S.P. Sineokij // – 2020. – RU2713124.

169. Yuzbasheva, E. Y. Inactivation of *Yarrowia lipolytica* *YIACL2* gene coding subunit of ATP citrate lyase using CRISPR/Cas9 system / E. Y. Yuzbasheva, T. V. Yuzbashev, E. B. Vinogradova, I. M. Kosikhina, M. O. Taratynova, D. A. Dementev, A. I. Solovyev, D. A. Egorova, S. P. Sineoky // *Biotekhnologiya*. – 2020. – V. 36. – P. 16-24. <https://www.doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-1-16-24>
170. Zhang, C. Production of Terpenoids by Synthetic Biology Approaches / C. Zhang, K. Hong // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2020. – V. 8. – P. 347. <https://www.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00347>
171. Zhang, G. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for terpenoids production: advances and perspectives / G. Zhang, H. Wang, Z. Zhang, K. J. Verstrepen, Q. Wang, Z. Dai // *Crit Rev Biotechnol*. – 2021. – V. 42(4). – P. 618-633. <https://www.doi.org/10.1080/07388551.2021.1947183>
172. Zhang, J. L. High production of triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* through manipulation of lipid components / J. L. Zhang, Q. Y. Bai, Y. Z. Peng, J. Fan, C. C. Jin, Y. X. Cao, Y. J. Yuan // *Biotechnol Biofuels*. – 2020. – V. 13. – P. 133. <https://www.doi.org/10.1186/s13068-020-01773-1>
173. Zhang, S. Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry / S. Zhang, J. Wang, H. Jiang // *Food Chem*. – 2021. – V. 346. – P. 128860. <https://www.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128860>
174. Zhang, X. K. Metabolic engineering of beta-carotene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* / X. K. Zhang, D. N. Wang, J. Chen, Z. J. Liu, L. J. Wei, Q. Hua // *Biotechnol Lett*. – 2020. – V. 42(6). – P. 945-956. <https://www.doi.org/10.1007/s10529-020-02844-x>
175. Zhang, Y., Nielsen, J. Engineering yeast metabolism for production of terpenoids for use as perfume ingredients, pharmaceuticals and biofuels / Y. Zhang, J. Nielsen, Z. Liu // *FEMS Yeast Res*. – 2017. – V. 17(8). <https://www.doi.org/10.1093/femsyr/fox080>
176. Zhang, Y. High-level production of linalool by engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring dual mevalonate pathways in mitochondria and cytoplasm / Y. Zhang, J. Wang, X. Cao, W. Liu, H. Yu, L. Ye // *Enzyme Microb Technol*. – 2020. – V. 134. – P. 109462. <https://www.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109462>
177. Zhang, Y., Wang, Y. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains / Y. Zhang, Y. Wang, M. Yao, H. Liu, X. Zhou, W. Xiao, Y. Yuan // *Biotechnol Lett*. – 2017. – V. 39(7). – P. 1033-1039. <https://www.doi.org/10.1007/s10529-017-2331-4>
178. Zhao, Y. High-efficiency production of bisabolene from waste cooking oil by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica* / Y. Zhao, K. Zhu, J. Li, Y. Zhao, S. Li, C. Zhang,

- D. Xiao, A. Yu // *Microb Biotechnol.* – 2021. – V. 14(6). – P. 2497-2513.
<https://www.doi.org/10.1111/1751-7915.13768>
179. Zhou, F. A recruiting protein of geranylgeranyl diphosphate synthase controls metabolic flux toward chlorophyll biosynthesis in rice / F. Zhou, C.-Y. Wang, M. Gutensohn, L. Jiang, P. Zhang, D. Zhang, N. Dudareva, S. Lu // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – V. 114(26). – P. 6866-6871. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.1705689114>
180. Zhou, P. Combinatorial Modulation of Linalool Synthase and Farnesyl Diphosphate Synthase for Linalool Overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* / P. Zhou, Y. Du, X. Fang, N. Xu, C. Yue, L. Ye, // *J Agric Food Chem.* – 2021. – V. 69(3). – P. 1003-1010.
<https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06384>
181. Zhou, P. Improved linalool production in *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution of linalool synthase and overexpression of the complete mevalonate pathway / P. Zhou, Y. Du, N. Xu, C. Yue, L. Ye // *Biochemical Engineering Journal.* – 2020. – V. 161. – P. 107655. <https://www.doi.org/10.1016/j.bej.2020.107655>
182. Zhou, P. Highly efficient biosynthesis of astaxanthin in *Saccharomyces cerevisiae* by integration and tuning of algal crtZ and bkt / P. Zhou, L. Ye, W. Xie, X. Lv, H. Yu // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2015. – V. 99(20). – P. 8419-8428.
<https://www.doi.org/10.1007/s00253-015-6791-y>
183. Zhou, Y. J. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production / Y. J. Zhou, W. Gao, Q. Rong, G. Jin, H. Chu, W. Liu, W. Yang, Z. Zhu, G. Li, G. Zhu, L. Huang, Z. K. Zhao // *J Am Chem Soc.* – 2012. – V. 134(6). – P. 3234-3241. <https://www.doi.org/10.1021/ja2114486>
184. Zhu, H. Z. Production of High Levels of 3S,3'S-Astaxanthin in *Yarrowia lipolytica* via Iterative Metabolic Engineering / H. Z. Zhu, S. Jiang, J. J. Wu, X. R. Zhou, P. Y. Liu, F. H. Huang, X. Wan // *J Agric Food Chem.* – 2022. – V. 70(8). – P. 2673-2683.
<https://www.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08072>
185. Zielinska-Blajet, M. Monoterpenes and Their Derivatives-Recent Development in Biological and Medical Applications / M. Zielinska-Blajet, J. Feder-Kubis // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21(19). <https://www.doi.org/10.3390/ijms21197078>
186. Zinder, R. Vitamin A and Wound Healing/ R. Zinder, R. Cooley, L. G. Vlad, J. A. Molnar // *Nutr Clin Pract.* – 2019. – V. 34(6) – P. 839-849. <https://www.doi.org/10.1002/ncp.10420>
187. Zografos, A. L. From biosynthesis to total synthesis: strategies and tactics for natural products / A. L. Zografos // Hoboken, New Jersey: Wiley. – 2016. – P. 1-569.
<https://www.doi.org/10.1002/9781118754085>

VII. СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1. Схематичное изображение соединения активированных изопреновых молекул IPP и DMAPP по принципу «голова к хвосту» (линия связи выделена фиолетовым). Сверху в молекуле изопрена розовым цветом выделено расположение «головы» и зеленым – «хвоста».

Рисунок 2. Классификация терпенов по числу звеньев мономера из пяти атомов углерода. Конденсация двух одинаковых молекул изображена как $\times 2$; реакция с участием присоединения изопентилдифосфата схематично показана как $+IPP$.

Рисунок 3. Химическая структура энантиомеров линалоола: R-(-)-линалоол и S-(+)- линалоол.

Рисунок 4. Схема эксперимента по инактивации гена *YlACL2* путем встраивания генетической конструкции $fYlACL2-URA3lox$ в локус на хромосоме *Y. lipolytica* (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

Рисунок 5. Фенотип прототрофных по урацилу трансформантов (1–24), отобранных в результате трансформации штамма *Y. lipolytica* W29(Ura⁻) кассетой $fYlACL2-URA3lox$, на агаризованной среде YNBCitr, содержащей цитрат в качестве единственного источника углерода (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

Рисунок 6. Фенотип рекомбинантов, несущих мутацию $\Delta YlACL2$, в минимальной жидкой среде YNBCitr с цитратом в качестве единственного источника углерода (1, 2). Культуры растили при 30 °C в течение 4 сут. Пробирки засеивали до начального титра клеток $3 \cdot 10^5$ кл/мл. 1 – штамм W29 $\Delta YlACL2$, полученный посредством гомологичной рекомбинации с использованием конструкции $fYlACL2-URA3lox$; 2 – штамм W29 $\Delta YlACL2$, полученный с помощью CRISPR-Cas9 системы редактирования генома; 3 – контрольный штамм W29 (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

Рисунок 7. Фенотип трансформантов (1–24), отобранных в результате трансформации штамма *Y. lipolytica* W29(Ura⁻) плазмидой pCRISPR-hph-sgYlACL2, на агаризованной среде YNBCitr, содержащей цитрат в качестве единственного источника углерода (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

Рисунок 8. Результаты секвенирования консервативного домена гена *YlACL2* трансформантов № 2, 3 и 5, проведенного для подтверждения инактивации гена. Серым выделена последовательность 20 п.н. ДНК-мишени, подчеркиванием выделен смежный мотив протоспейсера (PAM) (Yuzbasheva *et al.*, 2020b).

Рисунок 9. Схема получения вспомогательной плазмиды для интеграции с помощью CRISPR-Cas9 (Yuzbashev *et al.*, 2022). Показано встраивание последовательности sgRNA путем рекомбинации последовательности плазмиды pCasNA-RK и одноцепочечного олигонуклеотида.

Олигонуклеотид имеет длину 90 нуклеотидов, 20 из которых комплиментарны сайту интеграции в геноме *Y. lipolytica*. Сокращения: Cas9-SV40 - ген *Cas9* с NLS SV40; Km-R - ген устойчивости к канамицину; Nat-R - ген устойчивости к ноурсеотрицину; Pol III Pro - гибридный промотор SCRI'- tRNAGly РНК-полимеразы III; PoI III Ter – последовательность терминатора РНК-полимеразы III.

Рисунок 10. Схема инактивации гена *DGKI* путем внесения двуцепочечного разрыва (места разрывов показаны пунктиром с ножницами), опосредованного CRISPR-Cas9 и интеграции фрагмента ДНК длиной 120 п.н., состоящего из последовательностей, гомологичных областям, расположенным выше и ниже *DGKI*. Сайты отжига проверочных праймеров обозначены буквами F и R.

Рисунок 11. Кривые роста трансформантов W29 (*ScSUC2 HXK1*) #1, #2 и W29 (*Δpex10 ACBP ZWF1 ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1*) #3, #4 и контрольного дикого штамма W29 при культивировании в минимальной среде YNB, содержащей 8 г/л сахарозы в качестве единственного источника углерода (Taratynova *et al.*, 2021).

Рисунок 12. Схема мевалонатного пути синтеза веществ терпенового ряда. Нативные гены *Y. lipolytica*, сверхэкспрессия которых по литературным данным положительно сказывается на продукции терпеноидов, выделены розовым, гетерологичные гены, интеграция которых упомянута в последующих разделах работы, выделены фиолетовым цветом. На схеме представлены гены, кодирующие ферменты: линалоолсинтазу (*AaLIS Actinidia argute*); фитоендегидрогеназу (*CarB Mucor circinelloides*); бифункциональный фермент фитоенсинтазу и ликопинсинтазу (*CarRP M. circinelloides*); геранилдифосфатсинтазу *CrGPPS Catharanthus roseus*; геранилгеранилдифосфатсинтазу (*GGPPs7 Synechococcus sp.*, *GGSI Y. lipolytica*, *OsGGPPS1 Oryzae sativa*, *SaGGPPS S. acidocaldarius*); фарнезилдифосфатсинтазу (*ERG20 Y. lipolytica* и два мутантных аллеля *ERG20^{F88C}*, *ERG20^{F88W-N119W}*); β-каротингидроксилазу (*HpCrtZ H. pluvialis*, *AacrtZ Agrobacterium aurantiacum*); β-каротинкетотазу (*HpBKT H. pluvialis*, *BvcrtW Brevundimonas vesicularis* и *AspcrtW Alcaligenes sp.*).

Рисунок 13. Продукция линалоола сконструированными штаммами *Y. lipolytica* при двухфазном культивировании в колбах. Клетки культивировали в богатой среде YP с сахарозой (90 г/л) в качестве источника углерода в течение 5 дней, на 3-и сутки был добавлен изопропилмиририлат (IPM). Планки погрешностей указывают на стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов (Taratynova *et al.*, 2023). В таблице под диаграммой число знаков «+» обозначает число копий конструкции, приведенной в крайнем левом столбце.

Рисунок 14. 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 ИРМ. Показаны средние значения трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение (Taratynova *et al.*, 2023).

Рисунок 15. Результаты культивирования штамма G12 в колбах. Концентрации линалоола (светло-зеленая штрихпунктирная линия), биомассы (зеленая штрихпунктирная линия с двумя точками), сахарозы (розовая пунктирная линия), глюкозы (фиолетовая точечная пунктирная линия с кружками) и фруктозы (синяя линия) (Taratynova *et al.*, 2023). Показано среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

Рисунок 16. Схема интеграции экспрессионной кассеты *CarRP-CarB-GGS1* с фланирующими областями гомологии длиной 500 п.н. к заданному участку на хромосоме в геном *Y. lipolytica* с помощью системы редактирования CRISPR-Cas9. Белой стрелкой показано место внесения двуцепочечного разрыва ДНК эндонуклеазой Cas9, ассоциированной с единой направляющей sgRNA.

Рисунок 17. Схематичное изображение набора двух вариантов конструкций, используемых для интеграции конструкции *IntE1-CarRP-CarB-GGS1* в геном штамма ВКПМ Y-4620 совместно с вспомогательной плазмидой pCasNA-IntE1. А - кассета *IntE1-CarB-CarRP-GGS1* в виде плазмиды, Б - кассета *IntE1-CarB-CarRP-GGS1* в виде линейного фрагмента.

Рисунок 18. Изображение клеток штаммов ВКПМ Y-4620 (слева) и GBK1 (справа), выросших на жидкой среде YP с сахарозой 20 г/л. Изображение получено с помощью фазово-контрастной микроскопии, увеличение $\times 90$.

Рисунок 19. Оценка влияния экспрессии геранилгеранилдифосфатсинтаз на продукцию β -каротина относительно родительского штамма GBK1. Показано среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

Рисунок 20. Продукция β -каротина сконструированными штаммами *Y. lipolytica*. Клетки культивировали с сахарозой в качестве источника углерода в пробирках в течение 5 дней. Показано среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

Рисунок 21. Биосинтез β -каротина в ферментере. А - результаты культивирования штамма GBK7 в 3-л биореакторе. Показана динамика изменения титра β -каротина и количества биомассы. Б – Микрофотография клеток штамма GBK7, демонстрирующая образование кристаллов β -каротина, имеющих характерный оранжевый цвет. Результат световой микроскопии культуры показан слева, результат поляризационной микроскопии - справа. Длина масштабной линейки составляет 5 мкм (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Рисунок 22. Интенсивность флуоресценции клеток штамма GF1, несущего ген *hrGFP* под контролем промотора pAraDH2, при росте на минимальных средах с добавлением сахарозы (YNBSuc, черные круги) или D-глюкозы (YNBD, белые ромбы) в качестве единственного источника углерода. Показаны средние значения трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

Рисунок 23. Интенсивность флуоресценции биомассы штамма GF1, несущего *hrGFP* под контролем промотора pAraDH2, при росте на минимальных средах с сахарозой с добавлением D-маннитола (YNBSuc/Man, черные круги), D-сорбитола (YNBSuc/Sorb белые ромбы) или D-фруктозы (YNBSuc/Fru серые квадраты) в качестве единственного источника углерода. Показаны средние значения трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение. Синей пунктирной линией показаны средние значения интенсивности флуоресценции клеток штамма GF1 в минимальной среде с добавлением сахарозы (YNBSuc).

Рисунок 24. Слева: биомасса исходного штамма ВКПМ Y-4967 (1) и штамма-продуцента β -каротина ВКПМ Y-5032 (2) на богатой агаризованной среде YPSuc2. Справа: схема конструкции, интегрированной в геном штамма ВКПМ Y-4967 с получением штамма ВКПМ Y-5032. Слитые гены *CarRP-GGPPSs7* находятся под контролем промотора pAraDH2, ген *CarB* под контролем промотора pTEF.

Рисунок 25. Накопление β -каротина, кантаксантина и астаксантина сконструированными штаммами *Y. lipolytica* при культивировании в пробирках. Клетки растили на среде YP с сахарозой в качестве источника углерода в пробирках в течение 5 дней. На диаграмме результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение (Yuzbasheva *et al.*, 2022). В таблице под диаграммой число знаков «+» обозначает число копий конструкции, приведенной в крайнем левом столбце.

Рисунок 26. Влияние экспрессии слитых генов *HpBKT* и *HpCrtZ* на накопление астаксантина (А). Повышение продукции астаксантина путем экспрессии слитых геранилгеранилдифосфатсинтаз с бифункциональной ликопинциклазой/фитоенсинтазой вместе с дополнительными копиями гена фитоендегидрогеназы (Б). Результаты представлены как среднее значение трех независимых

экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Рисунок 27. Культивирование штамма ВКПМ Y-4871 с периодической подпиткой в 3-литровых биореакторах с глюкозой в качестве источника углерода. Осуществлялась постоянная подпитка смесью глюкозы и гидро- и дигидрофосфатов аммония (как описано в материалах и методах). А - начальная концентрация глюкозы - 5 г/л и скорость подачи подпитки - 5 г/ч. Б - начальная концентрация глюкозы 5 г/л и скорость подачи подпитки - 8,5 г/ч. В - начальная концентрация глюкозы - 5 г/л и скорость подачи подпитки - 12,5 г/ч. Г - начальная концентрация глюкозы - 57 г/л и скорость подачи подпитки - 8,5 г/ч (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Рисунок 28. Микрофотография клеток штамма ВКПМ Y-4871. Микроскопировали клетки ВКПМ Y-4871, выращенные в 3-литровых биореакторах с глюкозой в качестве источника углерода (начальная концентрация глюкозы 5 г/л и скорость подачи подпитки - 12,5 г/ч). Верхнее изображение каждой пары было получено с помощью обычного освещения, нижнее – с помощью освещения поляризованным светом. А, анализ культуры в ходе процесса культивирования. С течением процесса культивирования видно образование кристаллов темно-красного цвета, характерного для астаксантина. Б, Клетки, внутри которых видны ярко-розовые кристаллы. В. Крупный план редких ярко-розовых кристаллов, показанных на рисунке. Масштабные полосы соответствуют 5 мкм (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Рисунок 29. Периодическое культивирование штамма ВКПМ Y-4871 с подпиткой в 100-литровом биореакторе с глицерином в качестве источника углерода. Начальная концентрация глицерина составляла 31 г/л, а непрерывную подачу смеси глицерина и гидро- и дигидрофосфатов аммония обеспечивали с расходом подпитки 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 (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Рисунок 30. ВЭЖХ-анализ астаксантина, полученного в результате культивирования штамма ВКПМ Y-4871 в 100-литровых биореакторах. Красная кривая соответствует образцу астаксантина, извлеченного из биомассы штамма ВКПМ Y-4871, а синяя - синтетическому астаксантину. Синтетический астаксантин содержал смесь энантиомеров (3S,3'S), (3R,3'S) и (3R,3'R), а астаксантин, продуцируемый штаммом *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4871, был оптически гомогенным и содержал только (3S,3'S) энантиомер (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Рисунок 31. Культивирование штамма ВКПМ Y-4871 в 3-литровых биореакторах с глюкозой и добавлением оливкового масла. А – Динамика показателей при добавлении оливкового масла до конечной концентрации 5% (об./начального об.) в начальный момент времени, через 76 часов и 123 часа после начала процесса. Б - Динамика показателей при добавлении оливкового масла в

конечной концентрации 5% (об./начального об.) через 19, 76 и 123 часа после начала процесса. В - Динамика показателей при добавлении оливкового масла до конечных концентраций 15% и 35% (об./начального об.) через 0 ч и 72 ч соответственно. Г - астаксантин в культуральной жидкости, Д - астаксантин в верхней масляной фазе, Е - астаксантин в предварительно промытых водой клетках. Образец для микроскопии отбирали на 142 час культивирования из биореактора, в который вносили оливковое масло в количестве 5% (об./начального об.) в начальный момент времени, через 76 ч и 123 ч после начала процесса. Изображения слева получены с помощью освещения обычным светом, справа – поляризованным. Масштабная линейка соответствует 5 мкм (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

Рисунок 32. Содержание астаксантина в масляной фазе, собранной в разные моменты времени культивирования штамма ВКПМ Y-4871 в условиях внесения оливкового масла в количестве 15% (об./начального об.) и 35% (об./начального об.) в начала процесса и через 72 ч культивирования, соответственно. Показаны средние значения трех технических повторностей (Yuzbasheva *et al.*, 2022).

VIII. ПРИЛОЖЕНИЕ

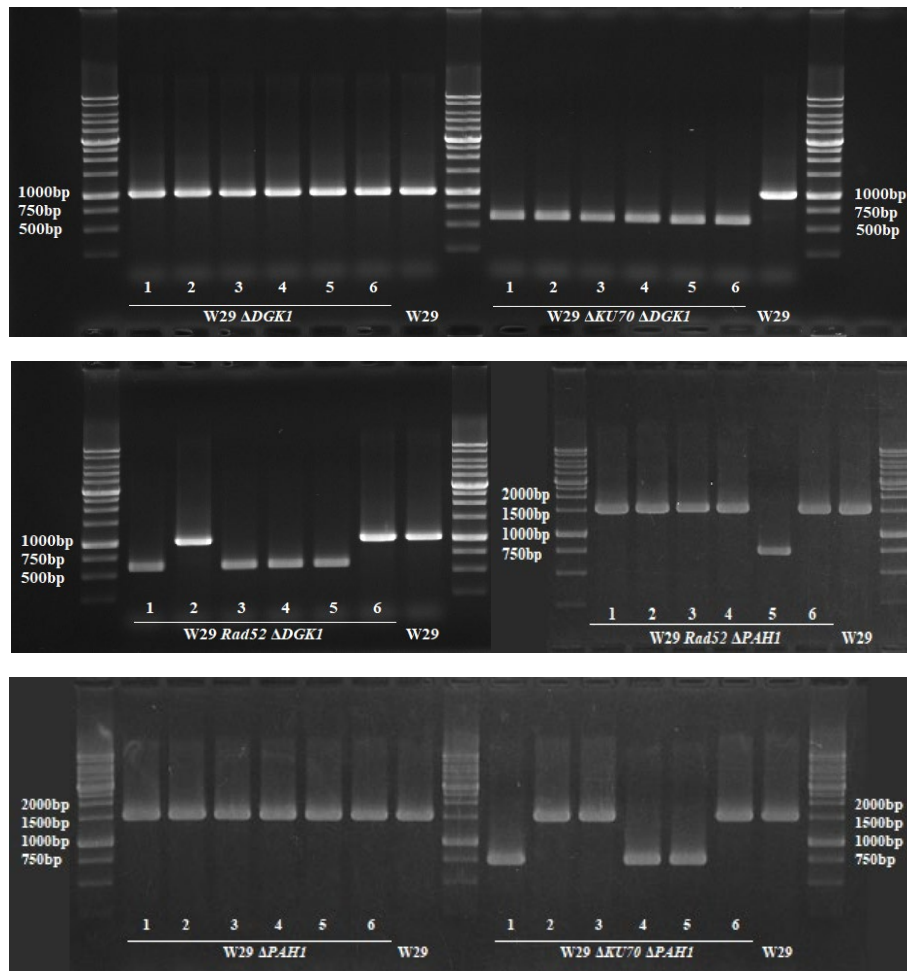


Рисунок S1. Электрофореграмма ПЦР, предназначенных для проверки наличие делеций. Гнеомную ДНК амплифицировали по праймерам Oligo110/Oligo111 для гена *DGK1* (размер продукта с дикого локуса *DGK1* – 1017 п.н., с мутантного - 580 п.н.) и по праймерам Oligo146/Oligo147 для гена *PAH1* (размер продукта с дикого локуса *PAH1* – 1609 п.н., с мутантного - 763 п.н.).

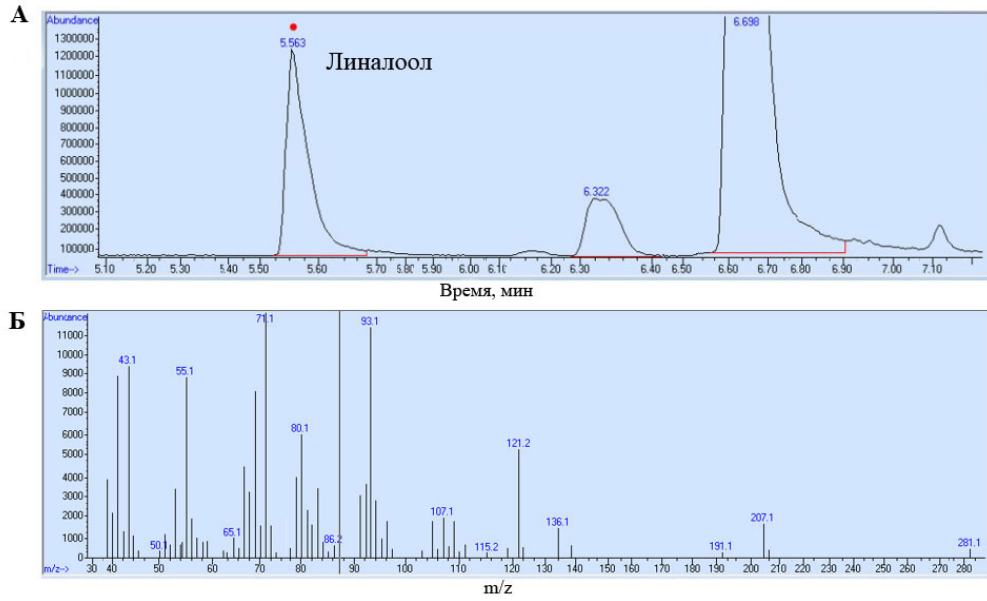


Рисунок S2. Масс-спектры пика линалоола. А - Результаты газовой хроматографии - масс-спектрометрии для экстракта линалоола из биомассы штамма G5. Б - Масс-спектры пика линалоола из биомассы штамма G5.

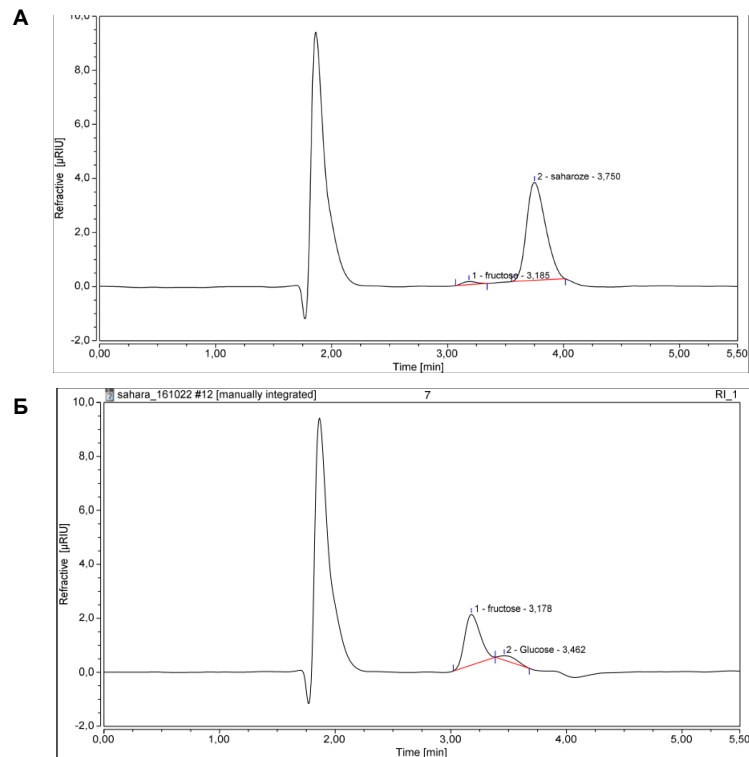


Рисунок S3. ВЭЖХ-профиль супернатанта, собранного при культивировании штамма G12 в колбах: А – через 0 ч, Б – через 48 ч.

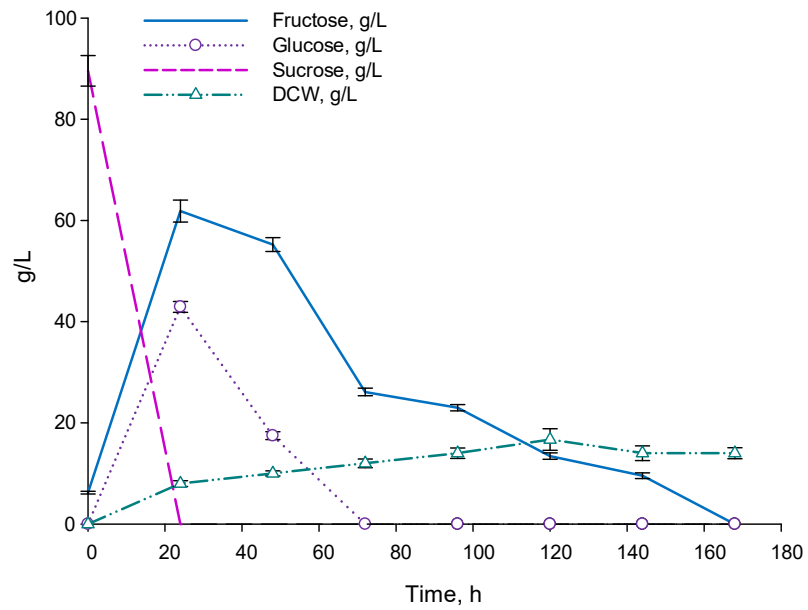


Рисунок S4. Результаты 7-дневного культивирования штамма G2 в колбах. Концентрации линалоола (светло-зеленая штрихпунктирная линия), биомассы (зеленая штрихпунктирная линия с двумя точками), сахарозы (розовая пунктирная линия), глюкозы (фиолетовая точечная пунктирная линия с кружками) и фруктозы (синяя линия). Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

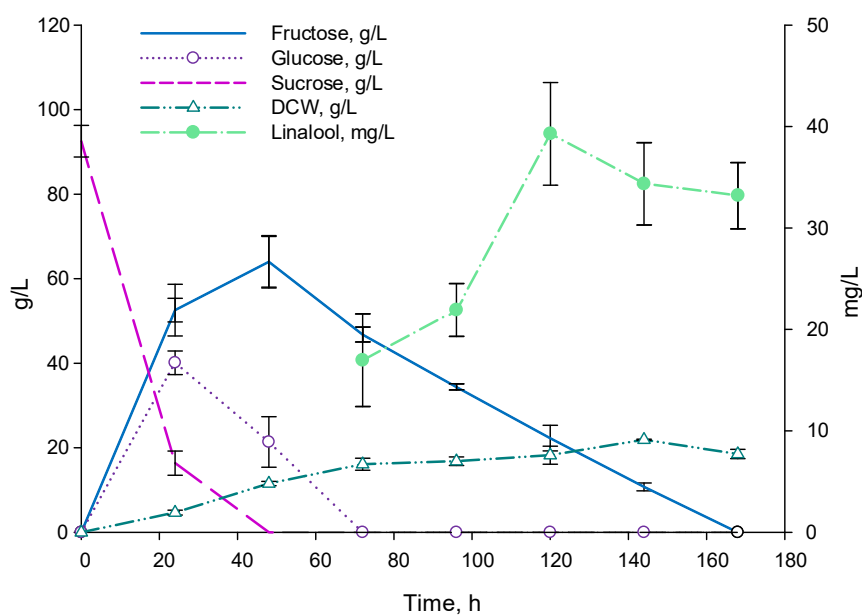


Рисунок S5. Результаты 7-дневного культивирования штамма G9 в колбах. Концентрации линалоола (светло-зеленая штрихпунктирная линия), биомассы (зеленая штрихпунктирная линия с двумя точками), сахарозы (розовая пунктирная линия), глюкозы (фиолетовая точечная пунктирная линия с кружками) и фруктозы (синяя линия). Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

А



Б



Рисунок S6. 3-литровые биореакторы в конце ферментации с периодической подпиткой штамма ВКПМ Y-4871 (А). Б – Собранная биомасса штамма ВКПМ Y-4871 (Б).

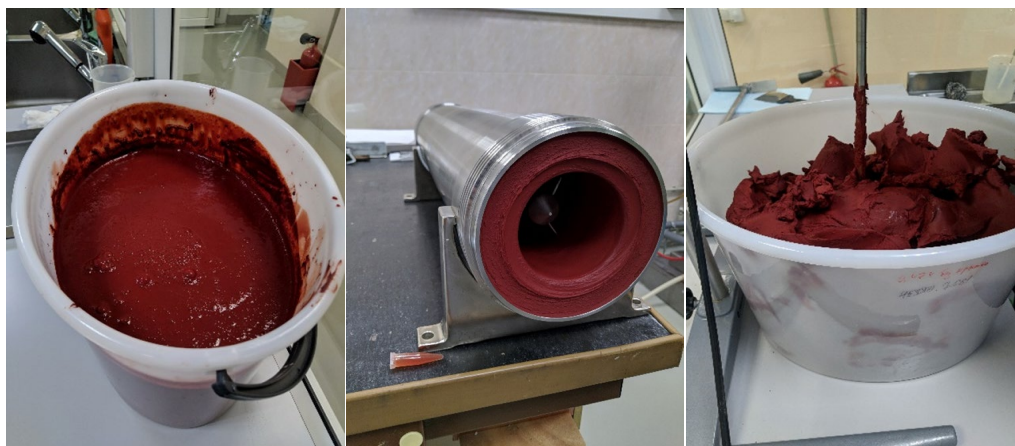


Рисунок S7. Биомасса штамма ВКПМ Y-4871, собранная после ферментации с периодической подпиткой в 100-литровом биореакторе.

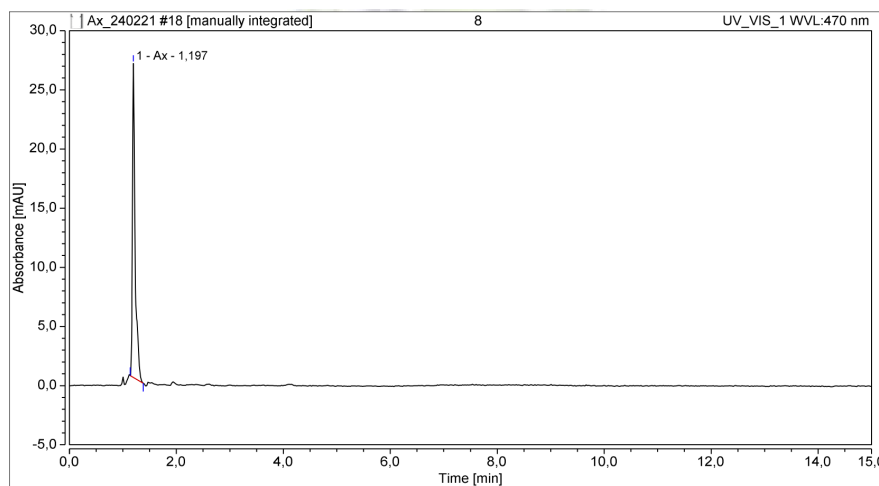


Рисунок S8 Профиль ВЭЖХ масляной фазы, собранной по окончании периодической ферментации штамма ВКПМ Y-4871 с подпиткой с добавлением масла до конечной концентрации 15% и 35% (об./начального об.) через 0 ч и 72 ч, соответственно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность д.б.н. Синеокому Сергею Павловичу за руководство и активное участие в подготовке диссертации. Автор выражает глубочайшую благодарность к.б.н. Юзбашевой Евгении Юрьевне, первому научному руководителю данной работы, за помощь и поддержку на всех этапах работы.

Особую благодарность автор выражает Мелькиной Ольге Евгеньевне за помощь и активное участие в описании нового промотера дрожжей *Y. lipolytica*, а также за проведение анализа ВЭЖХ для всех необходимых для данной работы образцов.

Автор выражает благодарность всему коллективу Биоресурсного центра - Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов. Автор выражает особую благодарность Дмитрию Алексеевичу Дементьеву и Федяевой Юлии Михайловне за помощь в выполнении экспериментальной части работы.