

НОВЫЙ ПРОМОТОР *pAraDH2* ДЛЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДРОЖЖЕЙ *Yarrowia lipolytica*

© 2023 г. М. О. Таратынова¹*, Ю. М. Федяева¹, Д. А. Дементьев¹,
О. Е. Мелькина¹, Т. В. Юзбашев², С. П. Синеокий¹, Е. Ю. Юзбашева^{3,4}

¹НИЦ “Курчатковский институт”, Москва, 123182 Россия

²Plant Sciences and the Bioeconomy, Rothamsted Research, West Common, Harpenden AL5 2JQ, United Kingdom

³BioMediCan Inc., Encyclopedia Circle, Fremont 94538 CA, 40471 USA

⁴BioKai Inc., Encyclopedia Circle, Fremont 94538 CA, 40471 USA

*e-mail: mtaratynova@inbox.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 19.01.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2023 г.

Проведена оценка способности дрожжей *Yarrowia lipolytica* утилизировать ряд многоатомных спиртов в качестве единственных источников углерода. Для исследования эффективности промотора нативного гена *Y. lipolytica AraDH2*, кодирующего фермент D-маннит/D-арабитол-дегидрогеназу, при культивировании рекомбинантных дрожжей на минимальных средах с разными источниками углерода промоторная область гена *AraDH2* была транскрипционно слита с геном зеленого флуоресцентного белка *hrGFP* и трансформирована в *Y. lipolytica*. Используя описанный промотор, был сконструирован продуцирующий β -каротин штамм дрожжей *Y. lipolytica*, несущий гены *Mucor circinelloides CarRP* и *CarB*, кодирующие бифункциональный фермент фитоеен синтазу/ликопин β -циклазу (*carRP*) и фитоеен дегидрогеназу (*carB*), а также ген *GGPPS7* *Synechococcus* sp., кодирующий геранилгеранилпирофосфат синтазу. Введение в геном дрожжей нуклеотидной последовательности, кодирующей слитые *carRP* и *GGPPS7*, под регуляцией промотора *pAraDH2*, и гена *CarB* под контролем промотора *pTEF* привело к получению трансформанта, способного продуцировать 66.3, 121.2 и 148.9 мг/л β -каротина на 5 сутки культивирования в тестовых пробирках на среде с глицерином, сахарозой и глюкозой, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале промотора *pAraDH2* в сфере генетического конструирования.

Ключевые слова: *Yarrowia lipolytica*, промотор, многоатомные спирты, β -каротин, флуоресцентный анализ

DOI: 10.56304/S0234275823010106

ВВЕДЕНИЕ

Маслянистые дрожжи *Yarrowia lipolytica* представляют особый интерес в области биотехнологии. Метаболизм дрожжей характеризуется высокими потоками ацетил-КоА и цикла трикарбоновых кислот [1]. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) дрожжи *Y. lipolytica* классифицируются как безопасные (GRAS) [1]. Статус непатогенного и безопасного микроорганизма связан с тем, что эти дрожжи могут вызывать

только легкие инфекции у пациентов с тяжелым иммунодефицитом и неспособны расти при температуре выше 34°C. Дрожжи *Y. lipolytica* растут при широком диапазоне значений pH, а также на разных источниках углерода, в том числе на не содержащих глюкозу углеводах сельскохозяйственных или биотехнологических отходов [2]. Спектр потребляемых источников углерода у этого вида весьма широк: это как гидрофобные (алканы, алкены, жирные кислоты, метиловые эфиры жирных кислот и триглицериды), так и гидрофильные соединения (моносахариды, этанол, многоатомные спирты, органические кислоты) [2, 3]. К тому же благодаря новым успехам в метаболической инженерии список веществ, которые может ассимилировать *Y. lipolytica*, продолжает пополняться [4]. И наконец, расширение методологий метаболической инженерии и конструирования рекомбинантных штаммов с помощью

Список сокращений: (по алфавиту) *AraDH2* – ген, кодирующий фермент D-маннит/D-арабитол-дегидрогеназу; *CarB* – ген, кодирующий фермент фитоеен дегидрогеназу; *CarRP* – ген, кодирующий бифункциональный фермент фитоеен синтазу/ликопин β -циклазу; *GGPPs7* – ген, кодирующий фермент геранилгеранилпирофосфат синтазу; *hrGFP* – зеленый флуоресцентный белок; *ScSUC2* – ген, кодирующий фермент инвертазу.

Таблица 1. Штаммы дрожжей *Y. lipolytica*
Table 1. *Y. lipolytica* strains

Штамм	Генотип	Родительский штамм	Интегрируемая кассета	Вспомогательная плазмида pCasNa-
ВКПМ Y-3178	W29 MATa	—	—	—
ВКПМ Y-4967	W29 MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::URA3 P_{hp4d^-}$ $ZWF1 P_{hp4d^-} ACBP P_{hp4d^-} ACC1 P_{TEFin^-}$ $DGA1 P_{TEFin^-} ScSUC2 P_{TEFin^-} HXK1$	—	—	—
G1	W29 MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::URA3 P_{hp4d^-}$ $ZWF1 P_{hp4d^-} ACBP P_{hp4d^-} ACC1 P_{TEFin^-}$ $DGA1 P_{TEFin^-} ScSUC2 P_{TEFin^-} HXK1$ IntE8::P _{AraDH2} -GFP	ВКПМ Y-4967	pE8US1.1-P _{AraDH2} - GFP-T _{LIP2} (SmiI)	pCasNA-IntE8
ВКПМ Y-5032	W29 MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::URA3 P_{hp4d^-}$ $ZWF1 P_{hp4d^-} ACBP P_{hp4d^-} ACC1 P_{TEFin^-}$ $DGA1 P_{TEFin^-} ScSUC2 P_{TEFin^-} HXK1$ IntE8::P _{AraDH2} -CarRP-GGPPs7-P _{TEF} -CarB	ВКПМ Y-4967	pE8UA2.2-P _{AraDH2} - CarRP-GGPPs7- T _{ScADH1} -P _{TEF} -CarB- T _{LIP2} (SmiI)	pCasNA-IntE8

CRISPR-Cas9 редактирования генома и метода сборки ДНК Golden Gate, повышают привлекательность дрожжей в области применения их в биотехнологии [5].

В связи с выше описанным преимуществом, дрожжи *Y. lipolytica* способны с высоким выходом производить продукты липидной и не липидной природы, включая жирные и органические кислоты, белки, многоатомные спирты, терпены и терпеноиды [6, 7]. Благодаря генной инженерии дрожжи *Y. lipolytica* способны синтезировать β -каротин – терпеноид, относящийся к группе каротиноидов, вещество с высокими антиоксидантными свойствами, провитамин А. В работе Shuiliang Gao с соавторами в дрожжах *Y. lipolytica* под регуляцией конститутивных промоторов pEXP1 и pGPD1 проведена гетерологичная экспрессия генов, кодирующих бифункциональные ферменты фитоенсиназу/ликопенциклазу (carRP) и фитоендегидрогеназу (carB) из *Mucor circinelloides*, соответственно, что позволило получить базовый рекомбинантный штамм, синтезирующий 0.3 мг/г сухого веса (4.05 мг/л) β -каротина [8]. Последующей сверхэкспрессией ряда генов мевалонатного пути и интеграцией пяти копий генов *CarRP*, *CarB* получен итоговый штамм, продуцирующий 4.0 г/л β -каротина в биореакторе. Другой группой ученых во главе с M. Larroude благодаря сверхэкспрессии генов пути синтеза внутриклеточных липидов и гена повышающего пул предшественника β -каротина *GGSI* геранилгеранилдифосфат синтазы, а также введению одной копии гетерологичных генов *CarRP* и *CarB* под контролем промотора pTEF, получен штамм, который смог накапливать 35.7 мг/л (8.9 мг/г сухого веса) β -каротина [9].

Конечный сконструированный штамм с интегрированным геном *HMG1*, кодирующим гидроксиметилглутарил-КоА редуктазу и тремя копиями генов *CarRP*, *CarB* и *GGSI* в ферментере накапливал титр β -каротина 6.5 г/л (90 мг/г сухого веса).

Исследовательской группой во главе с Nan Wang был идентифицирован и охарактеризован ряд генов, включая ген *AraDH2* (g3858.t1, YALI0E05643g) с активностью NAD(H)-зависимой D-маннит/D-арабитол-дегидрогеназы [10]. Целью данной работы являлось использование впервые выявленного и описанного нами промотора гена *AraDH2* для конструирования штамма *Y. lipolytica*, продуцирующего β -каротин.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы и среды

В работе использованы штаммы дрожжей *Y. lipolytica*, перечисленные в табл. 1.

Для стандартных генно-инженерных работ (конструкция плазмид, наработка плазмидной ДНК) использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]). Бактерии выращивали при 37°C в среде LB (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5, при необходимости добавляли ампициллин (100 мкг/мл), хлорамфеникол (120 мкг/мл) или спектиномицин (50 мкг/мл).

Дрожжи *Y. lipolytica* культивировали при 30°C на минимальных средах: YNB, Himedia G091 – 0.67% yeast nitrogen base (Difco, США) с добавлением 0.1M калий-фосфатного буфера pH 6.7 и ис-

Таблица 2. Состав сред культивирования
Table 2. Composition of culture media

Название среды	Состав среды
YNBSuc2	YNB с сахарозой 20 г/л
YNBD2	YNB с глюкозой 20 г/л
YNBMan2	YNB с D-маннитом 20 г/л
YNBAra2	YNB с L-арабитолом 20 г/л
YNBSorb2	YNB с D-сорбитолом 20 г/л
YNBSuc	YNB с сахарозой 10 г/л
YNBD	YNB с глюкозой 10 г/л
YNBSuc/Fru,	YNB с сахарозой 10 г/л, D-фруктозой 10 г/л
YNBSuc/Man	YNB с сахарозой 10 г/л, D-маннитом 10 г/л 10 г/л
YNBSuc/Sorb	YNB с сахарозой 10 г/л, D-сорбитолом 10 г/л
YPSuc2	YP с добавлением сахарозы 20 г/л
YPSuc9	YP с добавлением сахарозы 90 г/л
YPGly9	YP с добавлением глицерина 90 г/л
YPD9	YP с добавлением глюкозы 90 г/л

Таблица 3. Праймеры, используемые в этом исследовании
Table 3. Primers used in this study

Номер	Название	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'
Oligo01	AraDH2-F	ATATCGTCTCATCGGGGTCTCAACGGATCGATGTATTCCGATTGGCTCGATTGAC
Oligo02	AraDH2-R	TTAACGTCTCAGGTCGGTCTCACATTGGATCCGATTGATTTTGTGTGTGTTGTGG
Oligo03	GGA-solo-F	ATATCGTCTCATCGGGGTCT
Oligo04	GGA-solo-R	TATACGTCTCTGGTCGGTCT
Oligo05	CarRP-F	ATATCGTCTCATCGGGGTCTCAAATGCTCCTGACCTACATGGA
Oligo06	CarRP-R	TTATACGTCTCTGGTCGGTCTCAGGCAATAGGGGCGGTGTAGAGATT
Oligo07	GGPPs7-F	ATATCGTCTCATCGGGGTCTCATGCCACGTCTAGCACAACCCACTGTAGACAAGGAA AGATGCGGAATCTCAACACCATCGGAGGCGGATCCGTGGCTCAAACSTTTAACCTG
Oligo08	GGPPs7-R	TATACGTCTCTGGTCGGTCTCATAGATTAATGCTGTGCGCCGGGTG
Oligo09	IntE8-20bp	TCGATGGGCCCCCGTTTCGATTCCGGGTCGGCGCAAGGATAGTGCTTGTGTCCAGGT TTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTAAAAATAAGGC
Oligo10	IntE8-chr-F	TAATCATACTGCGCCGTGCC
Oligo11	IntE8-chr-R	GGCTCTTAAAAGCGTTCAGA
Oligo12	OligUp-R	ACTATCGGTAGAGCCAATTAG
Oligo13	OligDn-F	GAAGTTGGTGAAAACATTTACG

точников углерода как описано в табл. 2; и на полноценных средах: (YP – пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л) с добавлением источников углерода как описано в табл. 2. При необходимости добавляли нурсеотрицин (Nat) в концентрации 250 мкг/мл или урацил 150 мкг/мл). Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/л.

Конструирование плазмид

Стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, трансформация *E. coli*) проводились в соответствии с лабораторным руководством по молекулярному клонированию [11]. Все ферменты для молекулярных работ были получены от компании Thermo Fisher

Таблица 4. Плазмиды, используемые в этом исследовании
Table 4. Plasmids used in this study

Названия плазмид	Детали сборки
Вспомогательные плазмиды для сборки методом Golden Gate	
pCasNA-RK	№175708 Addgene
pYTK001	№175709 Addgene
pE8US1.1	№175741 Addgene
pE8US1.2	№175742 Addgene
pE8UA2.2	№175700 Addgene
pGenC- <i>hrGFP</i>	№175722 Addgene
pProC-TEF1	№175721 Addgene
pYTK001-P _{AraDH2}	Golden Gate Assembly – <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo01/Oligo02; ВКПМ Y-4967 штамм)
pYTK001- <i>CarB</i>	Golden Gate Assembly – <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo03/Oligo04; <i>CarB</i> фрагмент)
pYTK001- <i>CarRP</i> -fus	Golden Gate Assembly – <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo05/Oligo06; <i>CarRP</i> -fus фрагмент)
pYTK001-fus- <i>GGPPs7</i>	Golden Gate Assembly – <i>Esp3I</i> : pYTK001 + ПЦР продукт (Oligo07/Oligo08; – fus- <i>GGPPs7</i> фрагмент)
pTerC-LIP2	№175723 Addgene
pTerC-ScADH1	№175724 Addgene
pE8US1.1-P _{AraDH2} - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T _{ScADH1}	Golden Gate Assembly – <i>Eco3II</i> : pE8US1.1 + pYTK001-P _{AraDH2} + pYTK001- <i>CarRP</i> -fus + pYTK001-fus- <i>GGPPs7</i> + pTerC-ScADH1
pE8US1.2-P _{TEF} - <i>CarB</i> -T _{LIP2}	Golden Gate Assembly – <i>Eco3II</i> : pE8US1.2 + pProC-TEF1 + pYTK001- <i>CarB</i> + pTerC-LIP2
Эписомальные Cas9-вспомогательные плазмиды	
pCasNA-IntE8	(Addgene №175704) Рекомбинирование плазмиды с олигонуклеотидом: pCasNA-RK и Oligo09
Экспрессионные плазмиды	
pE8US1.1-P _{AraDH2} - <i>GFP</i> -T _{LIP2}	Golden Gate Assembly – <i>Eco3II</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}	Golden Gate Assembly - <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}

Scientific (США). Праймеры для наработки фрагментов синтезированы фирмой “Евроген” (Россия) и приведены в табл. 3. Все плазмиды, участвующие в работе перечислены в табл. 4.

Для интеграции в локус IntE8 хромосомы *E. coli* дрожжей *Y. lipolytica* методом Golden Gate Assembly [12] как описано в табл. 4 был сконструирован набор экспрессионных плазмид, содержащий участки

гомологии (IntUp и IntDn) к локусу IntE8, промоторы P_{AraDH2}, P_{TEF} и терминаторы T_{LIP2}, T_{ScADH1}.

Гены *CarB*, *CarRP* *M. circinelloides* и *GGPPs7* *Synechococcus* sp. были кодон-оптимизированы для *Y. lipolytica* с помощью GenSmart Codon Optimization (<https://www.genscript.com>) и синтезированы в виде фрагментов ДНК компанией Twist Bioscience Corporation (США) (нуклеотидная генетическая последовательность приведена в табл. 5).

Таблица 5. Окончание

fus-GGPPs 7
ATATCGTCTCATCGGGGTCTCAAATGGTGGCTCAAACSTTTAACCTGGATACCTACCTATCTCAGCGACAGCAGCA AGTCGAGGAGGCATTGTCAGCTGCTCTTGTTCGGCGTATCCTGAGCGAATCTACGAGGCTATGCGATACTCTTTG CTCGCTGGCGGCAACGCTCTGCGACCCATCCTCTGTCTGGCAGCCTGCGAGCTTGTGGAGGGAGTGTGGAACAGG CCATGCCCACTGCTTGTGCTCTTGAGATGATCCACACCATGTCTCTGATTCACGACGATCTTCCCAGCCATGGACAA TGATGACTTCAGAAGAGGTAACCAACCAACCACAAGGTGTTTGGCGAGGACATCGCCATCTTGGCAGGCGACGCC CTCTTAGCSTATGCSTTTGAGCACATTCGCTCGCAGACGCGCGGAGTCCCTCCCCAGCTGGTGTGCAGGTTATTG CTCGAATTGGTCATGCTGTTGCCGCCACCGGTCTTGTGGAGGCCAGGTGGTAGATCTGGAATCGGAAGGCAAGGC CATCTCCSTAGAGACTCTGGAGTACATTCATTCACATAAGACGGGGCGTGTGGAGGCGTCCGTCGTGTCTGGA GGTATTCTCGCAGGACCCGACGAGGAGCTCCTCGTCTGGTCTCAGCCACTACGCCGAGATATAGGTTCTGGCCTCC AGATTGTCGACGACATCTGGACGTGACAGCCACTTCTGAGCAACTCGAAAGACCCGAGGCAAGGACAGGCTGC AGCGAAGGCCACATACCCGCTGCTGCTGGGCCTGGAAGCCTCACGTCAGAAGGCGGAGGAACATCCAGTCCGCC AAGGAGGCTCTGCGACCCTACGGCAGCCAAGCCGAACCTCTGCTCGCCCTGGCTGATTTTCATCACCCGGCGACAGC ATTAATCTATGAGACCGACCAGAGACGTATA
IntE8 Up
AAATATGAGGGAGAGGGCGACACTGTTGATTGCTTCAAGTTACCAACCCTAACTAACAGCATCTGTAGTCTGTAATCA CTGCTGTAAGTGTACATACTGTAAGTCTCTGCTGTATCGGTATGATGCACTTTGCTTTTTTACTGTTTGAATTTTTAG GACATGCTTCTGAAAGGCATGGGTTGTGCCCTGCCAACCAGTTTTTACTCCTTGCACGTGGGTTGCACCTCCAACCC ACAAACAGGTCGGAACATGTCTGCTTTCCGAGATCAATTCAACGACAGAGGCGATCGGAAACCAAGCTAACAGATG GTAATCATACTGCGCCGTGCCACGCTTACAAATCACAATGCACCTACTGTACATACTGTACGATTGTACTAGCAGA TACCCCATCTCAACAGCCCTGTACACAGCCCGCTAAACCTACTGTCACCATCGCTACTGCAGAGAAGAGGGCTAA CGCGAGTTTGTGTGTGGGGAGGGTGTGATCAGCTCCGA
IntE8 Dn
CTTCCAGTTGCCGTACAATGACTCAACCAAAATACGTTCAAGCCTGCTTTCAAGCCTGCGTGTCTTTCTGTCTCAT TAGTTGAACGTAGATCATCTGAGAGAAGTGGCAGACCGTGCAAACACAAGGGTGAGACTGATAGGACACTTGATC TGATCCAAAATTTGACAGAGGAAAAGTAGTTTTGAAGTTACTGAACGTTTCTTCTCCAATTGCTTCTAACCCCCC CCCACATAGGTTTCCGGGTCTGCCAGAGTTCGGACACAGAGACTTCAAACAAGTAAGTGACGACAAAATATGATCT CTGATGACAACCTTGAAGTGGCCATATCGCTAAAATACCCACCCTGAAGTCTTTTGGCTTCCCTTGCATTTGAAAGAC CACCTTGTAGATGACCAAAGGATGAAACCGCCATTTATAGGCTGCAAACAACAAAAAGCGACACGAAGCGATTG GCAAGAAAATATAGTAGATTGATACAATTGATTCATCTGTTATT

Эписомальная Cas9-вспомогательная плазмида рCasNA-IntE8 несущая ген *Cas9 Streptococcus pyogenes* и 20 п. н. ДНК-мишени к локусу IntE8 (табл. 6), предназначенная для интеграции экспрессионных кассет на хромосому дрожжей *Y. lipolytica* с помощью CRISPR-Cas9 системы редактирования генома, была получена рекомбинированием плазмиды рCasNA-RK с олигонуклеотидом Oligo09 (табл. 3), как описано в табл. 4.

Нуклеотидные последовательности клонированных ПЦР продуктов были определены секвенированием по обеим цепям ДНК.

Конструирование штаммов

В качестве исходного штамма использовался штамм дрожжей *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4967 W29($\Delta pex10 \Delta ku70::URA3 P_{hp4d}-ZWF1 P_{hp4d}-ACBP P_{hp4d}-ACCI P_{TEFin}-DGA1 P_{TEFin}-ScSUC2 P_{TEFin}-$

Таблица 6. Эффективность интеграции экспрессионных кассет в заданный локус на хромосоме E дрожжей *Y. lipolytica*
 Table 6. Efficiency of integration of expression cassettes into a certain locus on the E chromosome of yeast *Y. lipolytica*

Хромосома	E
Локус интеграции	IntE8
Участок гомологии IntUp на хромосоме	1739277–1739776
Участок гомологии IntDn на хромосоме	1740717–1741216
20 п.н. sgRNA используемых в Cas9-вспомогательной плазмиде	AGGATAGTGCTTGTGTCCAG
Эффективность интеграции, % (количество правильных клонов среди проверенных)	83% (10/12)

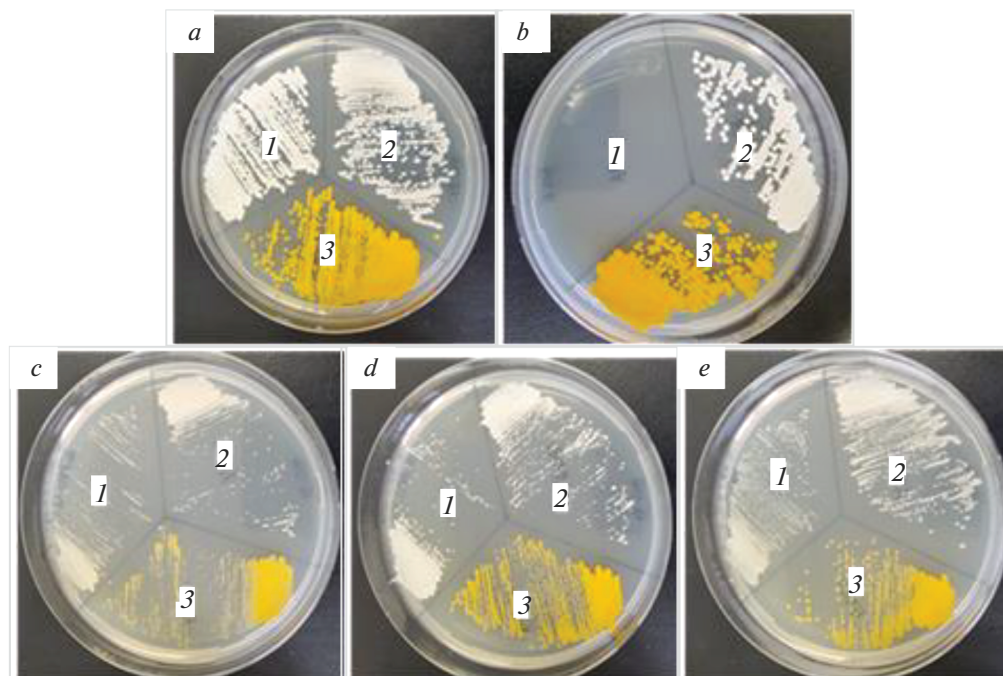


Рис. 1. Рост штаммов на третьи сутки на минимальной агаризованной среде с использованием в качестве единственного источника углерода: *a* – D-глюкозы (20 г/л), *b* – сахарозы (20 г/л), *c* – L-арабитола (20 г/л), *d* – D-маннита (20 г/л), *e* – D-сорбитола (20 г/л). Белые штаммы VKPM Y-3178 (W29, CLIB 89) (1), VKPM Y-4967 (2) и оранжевый штамм VKPM Y-5032 (3).

Fig. 1. Growth of strains on a minimal agarized medium with: *a* – D-glucose (20 g/L), *b* – sucrose (20 g/L), *c* – L-arabitol (20 g/L), *d* – D-mannitol (20 g/L), *e* – D-sorbitol (20 g/L), as the only carbon source. White strains VKPM Y-3178 (W29, CLIB 89) (1), VKPM Y-4967 (2) and the orange strain VKPM Y-5032 (3).

HXK1). Трансформацию штамма дрожжей *Y. lipolytica* проводили методом с использованием ацетата лития [12].

Штамм VKPM Y-4967 ко-трансформировали экспрессионной кассетой pE8US1.1-P_{AraDH2}-GFP-T_{LIP2} совместно с вспомогательной кольцевой плазмидой pCasNA-IntE8 в локус IntE8 хромосомы E (табл. 1). Конструирование осуществляли по методике, представленной в работе [12]. Экспрессионную кассету получали обработкой плазмиды pE8US1.1-P_{AraDH2}-GFP-T_{LIP2} эндонуклеазой рестрикции *SmiI*. Здесь и далее все трансформанты отбирали на среде YPSuc2 Nat (табл. 2) по устойчивости к нурсеотрицину. Для всех нижеперечисленных трансформантов была изолирована геномная ДНК 6 клонов и проведен ПЦР-анализ на правильность интеграции генетической кассеты по двум парам праймеров. Правильность интеграции оценивали по праймерам Oligo10/Oligo12 и Oligo13/Oligo11. Трансформант с интегрированной кассетой в нужный локус был отобран и обозначен как G1.

Штамм VKPM Y-4967 ко-трансформировали экспрессионной кассетой pE8UA2.2-P_{AraDH2}-CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1}-P_{TEF}-CarB-T_{LIP2} совместно с вспомогательной кольцевой плазмидой pCasNA-

IntE8 в локус IntE8 хромосомы E (табл. 1). Экспрессионную кассету получали обработкой плазмиды pE8UA2.2-P_{AraDH2}-CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1}-P_{TEF}-CarB-T_{LIP2} эндонуклеазой рестрикции *SmiI*. Правильность интеграции оценивали по праймерам Oligo10/Oligo12 и Oligo13/Oligo11). Один отобранный трансформант с интегрированной кассетой в нужный локус был депонирован как штамм дрожжей *Y. lipolytica* VKPM Y-5032 в Биоресурсном Центре Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВК-ПМ) НИЦ “Курчатовский институт”.

Измерение флуоресценции

Активность промотора pAraDH2 дрожжей *Y. lipolytica* оценивали с помощью экспрессии кодон-оптимизированного гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок *Renilla* (hrGFP) [13]. Для этого посевную культуру растили в жидкой YP-Suc2 среде в течение 24 ч, после чего в концентрации 3×10^5 кл/мл высевали в пробирки с жидкой средой YNBSuc и культивировали 16 ч при 275 об/мин и 30°C. Затем в 96-луночный планшет (Greiner Bio-One, Германия) переносили по 100 мкл культуры. В качестве бланка для каждого типа среды использовали лунку со 100 мкл среды

без клеток. OD_{600} и зеленую флуоресценцию измеряли с помощью планшетного люциметра CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) в течение 24 ч, т.к. плотность клеток не позволяла детектировать флуоресценцию на приборе после 24 ч культивирования. Измерения проводили при длине волны возбуждения 495 нм и испускания 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. Значения бланков вычитали из необработанной OD_{600} и относительных единиц флуоресценции (FLU). Скорректированные показания FLU в каждой точке делили на соответствующие значения OD_{600} , чтобы нормализовать FLU на клеточную массу для каждой лунки.

Культивирование

Культивирование рекомбинантных штаммов проводили в 50-миллилитровых пробирках с рабочим объемом 10 мл при температуре 30°C и постоянном перемешивании при 250 об/мин на протяжении 5 сут. в богатых средах YPGly9, YPSuc9, YPD9 (табл. 2). Посев инокулята вели до концентрации 3×10^5 клеток/мл. Посевную культуру выращивали в жидкой среде YPSuc2 в течение 24 ч.

Количественное определение содержания β -каротина и астаксантина

Каротиноиды экстрагировали из лиофилизированных клеток. Для этого к 7–13 мг лиофилизованного образца добавляли 150 мкл стеклянных шариков диаметром 425–600 мкм (Sigma-Aldrich, США) и 500 мкл ацетона (“Ясхим”, Россия), содержащего 0.01% 2,6-дитретбутил-4-метилфенола. Образцы встряхивали на гомогенизаторе Precellys®24 (Bertin Technologies, Франция) при 5500 об/мин 2 цикла по 20 с, центрифугировали при 18 000 g и собирали супернатант. Процедуру экстракции проводили четыре раза. Полученный объединенный экстракт анализировали методом ВЭЖХ с использованием системы Waters (Waters, Милфорд, Массачусетс, США), оснащенной колонкой WAT086344 C18 (3.9×150 мм, 4 мкм, 60Å, 1/пк Nova-Pak, США), со скоростью потока 1.0 мл/мин. Измерение проводили на диодно-матричном детекторе при 470 нм. Образцы были идентифицированы путем сравнения времени удерживания со стандартами β -каротина (Supelco, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Утилизация многоатомных спиртов дрожжами *Y. lipolytica*

Y. lipolytica утилизует широкий спектр субстратов, включая многоатомные спирты, среди

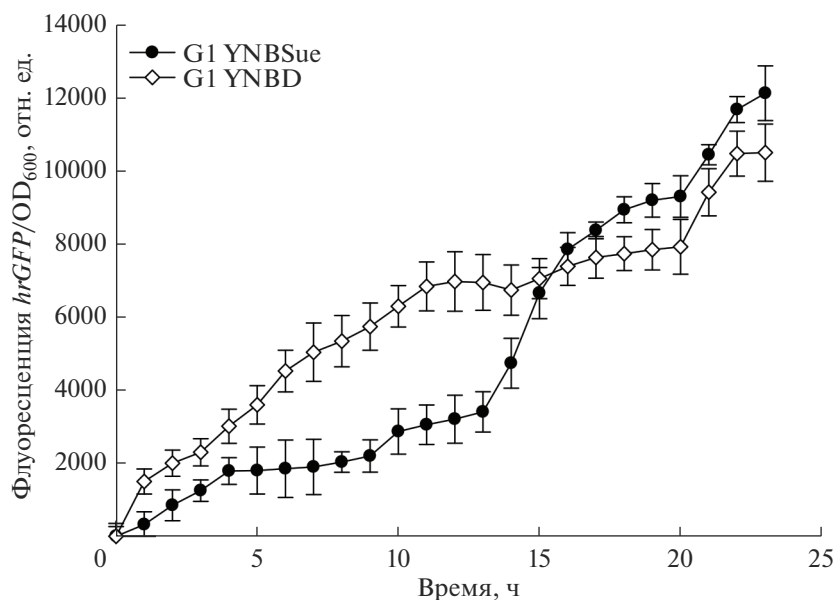


Рис. 2. Показатели флуоресценции штамма G1 с геном зеленого флуоресцентного белка *hrGFP* под контролем промотора pAraDH2 при росте на минимальных средах с добавлением в качестве единственного источника углерода сахарозы (YNBSuc) или D-глюкозы (YNBD).

Fig. 2. Fluorescence indices of the G1 strain with the gene of the green fluorescent protein *hrGFP* under the control of the promoter pAraDH2 when growing on minimal medium with the addition of sucrose (YNBSuc) or D-glucose (YNBD) as the only carbon source.

Таблица 7. Результаты 5-дневного культивирования штамма ВКПМ Y-5032 в богатой среде с разными источниками углерода

Table 7. The results of 5-day cultivation of strain VKPM Y-5032 on rich medium with various carbon sources

Источник углерода	Биомасса ^a , г/л	β-каротин, мг/г сухого веса	β-каротин, мг/л
Глицерин 9%	21.5 ± 0.6	3.1 ± 0.3	66.3 ± 7.8
Сахароза 9%	22.7 ± 0.5	5.3 ± 0.4	121.2 ± 6.8
Глюкоза 9%	23.7 ± 0.1	6.3 ± 0.6	148.9 ± 13.9

Примечание: ^a В расчете на сухую массу.

Note: ^a Calculated to dry weight.

которых выделяется глицерин, который является более предпочтительным субстратом по сравнению с глюкозой [14]. Мы оценили способность *Y. lipolytica* расти на манните, сорбитоле и арабитоле в качестве единственных источников углерода (рис. 1). Рост природного изолята дрожжей W29 *Y. lipolytica* (ВКПМ Y-3178), а также штаммов ВКПМ Y-4967 и ВКПМ Y-5032, участвующих в исследовании, при использовании в качестве единственного источника углерода L-арабитола был несколько снижен, по сравнению с D-маннитом и D-сорбитолом. Дрожжи *Y. lipolytica* способны утилизировать широкий спектр многоатомных спиртов в том числе за счет описанных ранее ферментов D-ман-

нит/D-арабитол-дегидрогеназ, которые кодируются генами *AraDH1* и *AraDH2* [10]. Анализ субстратной специфичности данных ферментов показал более высокую активность в направлении окисления маннита, арабитола и сорбитола до фруктозы, ксилулозы и сорбозы, соответственно, нежели наоборот восстановление перечисленных сахаров до соответствующих многоатомных спиртов [10].

Изучение pAraDH2 промотора

Продемонстрированный рост *Y. lipolytica* при использовании в качестве единственного источника углерода многоатомных спиртов (рис. 1) мо-

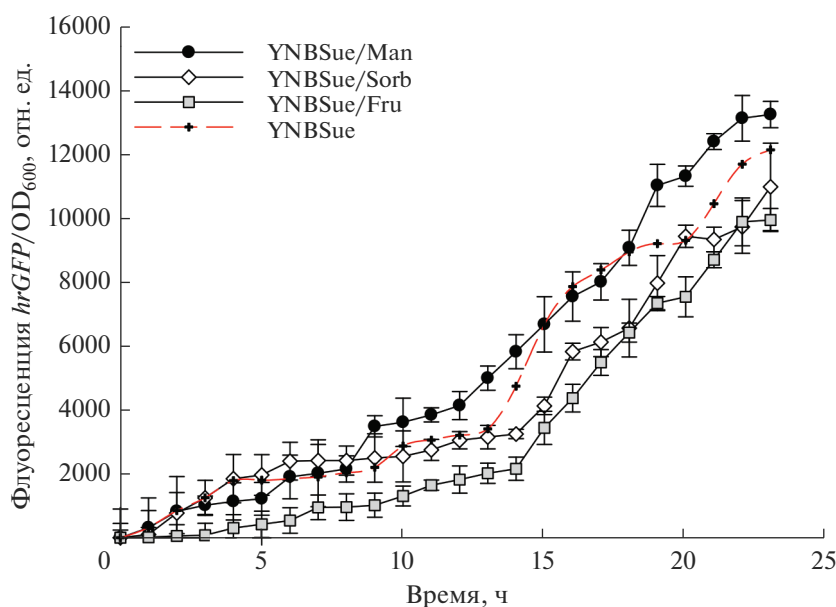


Рис. 3. Показатели флуоресценции штамма G1 с геном зеленого флуоресцентного белка *hrGFP* под контролем промотора pAraDH2 при росте на минимальных средах с сахарозой с добавлением в качестве единственного источника углерода D-маннита (YNBSuc/Man), D-сорбитола (YNBSuc/Sorb) или D-фруктозы (YNBSuc/Fru). Усредненные показатели флуоресценции штамма G1 в минимальной среде с добавлением сахарозы показаны красной пунктирной линией.

Fig. 3. Fluorescence indices of the G1 strain with the *hrGFP* green fluorescent protein gene under the control of the AraDH2p promoter when growing on minimal sucrose medium with the addition of D-mannitol (YNBSuc/Man), D-sorbitol (YNBSuc/Sorb) or D-fructose (YNBSuc/Fru) as the only carbon source. The average G1 strain fluorescence values in a minimal medium with the addition of sucrose are shown by the red dotted line.

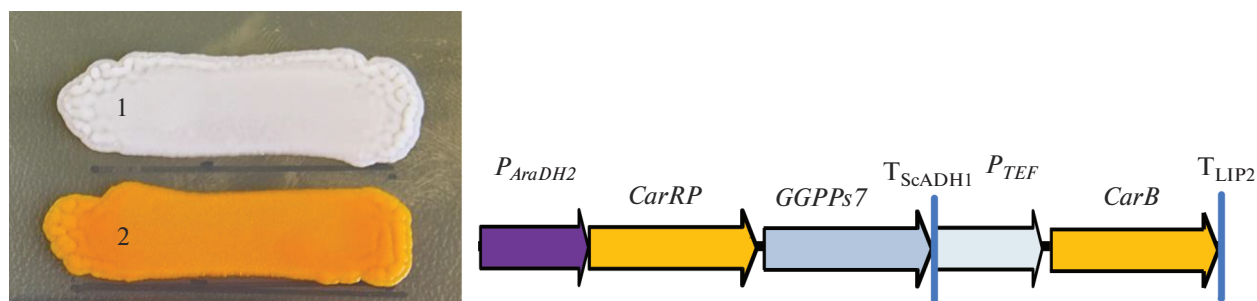


Рис. 4. Слева: белый штамм ВКПМ Y-4967 (1) и оранжевый штамм ВКПМ Y-5032 (2) на богатой агаризованной среде YPSuc2. Справа: схема введенной конструкции в штамм ВКПМ Y-4967 с получением штамма ВКПМ Y-5032. Слитые гены $CarRP$ - $GGPPs7$ находятся под контролем промотора $pAraDH2$, ген $CarB$ под контролем $pTEF$.

Fig. 4. Left: white strain VKPM Y-4967 (1) and orange strain VKPM Y-5032 (2) on rich YPSuc2 agarized medium. Right: scheme of the introduced construct in VKPM Y-4967 strain to obtain VKPM Y-5032 strain. The fused $CarRP$ - $GGPPs7$ genes are under the control of the $pAraDH2$ promoter, the $CarB$ gene by the $pTEF$ promoter.

жет говорить о высоком уровне экспрессии генов, участвующих в их утилизации, в том числе гена $AraDH2$. Уровень экспрессии этого гена при культивировании *Y. lipolytica* на минимальных средах с разными источниками углерода не был ранее исследован. Добавление маннита, сорбитола или арабитола в среду культивирования могло существенно повлиять на экспрессию этого гена.

Для изучения промоторной области гена $AraDH2$ был сконструирован штамм G1 (W29 MATa $\Delta pex10 \Delta ku70::URA3 ZWF1 ACBP ACC1 DGA1 ScSUC2 HXK1$ IntE8:: P_{AraDH2} - GFP), в котором ген зеленого флуоресцентного белка $hrGFP Renilla$ был интегрирован в геном в локус IntE8 на хромосому E под контролем $pAraDH2$ промотора. Чтобы исключить значения аутофлуоресценции в ходе анализа из полученных значений всегда вычитали значения флуоресценции родительского штамма — ВКПМ Y-4967, не содержащего гена GFP . Измерение флуоресценции проводили на минимальных средах YNB с добавлением в качестве единственного источника углерода сахарозы (YNBSuc), D-глюкозы (YNBD), а также смеси сахаров: сахарозы и D-фруктозы (YNBSuc/Fru), сахарозы и D-сорбитола (YNBSuc/Sorb), сахарозы и D-маннита (YNBSuc/Man) (табл. 2). Полученные результаты представлены на рис. 2 и 3.

При использовании глюкозы и сахарозы наблюдается различие в показателях флуоресценции в период с 5 по 14 час культивирования (рис. 2). Более высокий уровень флуоресценции на среде с глюкозой в ранние часы культивирования может быть связан с особенностями роста культуры на среде с сахарозой. Для утилизации сахарозы, в штамме G1 экспрессирован ген, кодирующий фермент инвертазу $ScSUC2 Saccharomyces cerevisiae$ [15]. Инвертаза $ScSUC2$ принадлежит к Gh32 семейству гликозидгидролаз и при секреции в среду культивирования катализирует внеклеточный гидролиз сахарозы с образованием эквимолярной сме-

си D-глюкозы и D-фруктозы [16]. Только после гидролиза происходит транспорт глюкозы и фруктозы в клетки и последующий катаболизм.

Добавление D-сорбитола или D-фруктозы в среду культивирования несколько (в среднем на 10 и 18%, соответственно, в период с 15 по 23 час культивирования) снижает флуоресценцию по сравнению с таковой при росте только на сахарозе (рис. 3). Наблюдается небольшое повышение флуоресценции в среднем на 8%, начиная с 15 часа культивирования, при добавлении D-маннита. Таким образом, добавление маннита или сорбитола в среду культивирования не оказывает существенного влияния на экспрессию $pAraDH2$ промотора.

Использование промотора $pAraDH2$ для конструирования продуцента β -каротина на дрожжах *Y. lipolytica*

Поскольку при экспрессии гена $hrGFP$ промотор $pAraDH2$ оказался достаточно эффективен, было решено протестировать его в рамках генетического конструирования штамма дрожжей *Y. lipolytica*, продуцирующего β -каротин. С этой целью была осуществлена гетерологичная экспрессия слитых генов $CarRP$ - $GGPPs7$ (RU 2794980), где ген $CarRP$ *M. circinelloides* кодирует бифункциональный фермент фитоен синтазу/ликопин β -циклазу, ген $GGPPs7$ *Synechococcus* sp. кодирует геранилгеранилпирофосфат синтазу, а ген $CarB$ *M. circinelloides*, кодирует фитоен дегидрогеназу. В данной конструкции экспрессия слитых генов $CarRP$ - $GGPPs7$ регулировалась промотором $pAraDH2$, а гена $CarB$ промотором $pTEF$ (рис. 4). Полученный в результате штамм ВКПМ Y-5032 культивировали в богатой среде YP с добавлением разных источников углерода: сахарозы 90 г/л (YPSuc9), глицерина 90 г/л (YPGly9), или глюкозы 90 г/л (YPD9). Результаты культивирования представлены в табл. 7.

Так, на среде с глюкозой продукция β -каротина характеризовалась самым высоким уровнем — 148.9 мг/л (6.3 мг/г сухого веса), на среде с глицерином — 66.3 мг/л (3.1 мг/г сухого веса), на среде с сахарозой — 121.2 мг/л (5.3 мг/г сухого веса).

Таким образом, был выявлен и исследован новый промотор гена *AraDH2*. Установлено, что промотор pAraDH2 экспрессируется при культивировании дрожжей *Y. lipolytica* на минимальной среде с добавлением разных источников углерода, при этом добавление маннита или сорбитола в среду культивирования не оказывает существенного влияния на экспрессию. Использование промотора pAraDH2 в целях контроля экспрессии генов *CarRP* и *GGPPS7* позволило получить рекомбинантный штамм, хорошо растущий на богатых средах с глюкозой, сахарозой или глицерином, и продуцирующий β -каротин с титром (до 148.9 мг/л), превышающим результаты, полученные при использовании промоторов pEXP1 и pGPD1 [8], а также pTEF [9] — 4.05 и 35.7 мг/л соответственно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства (Государственное задание № АААА-А20-120093090016-9) с использованием УНУ — Биоресурсный центр “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов” НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abdel-Mawgoud A.M., Markham K.A., Palmer C.M., Liu N., Stephanopoulos G., Alper H.S.* Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.*, 2018, 50, 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.016>
2. *Miller K.K., Alper H.S.* *Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103, 9251–9262. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10200-x>
3. *Barth G., Gaillardin C.* Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, 19(4), 219–237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>
4. *Ledesma-Amaro R., Nicaud J.M.* Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol.*, 2016, 34(10), 798–809. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>
5. *Larroude M., Rossignol T., Nicaud J. M., Ledesma-Amaro R.* Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Adv.*, 2018, 36(8), 2150–2164. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.004>
6. *Poorinmohammad N., Kerkhoven E.J.* Systems-level approaches for understanding and engineering of the oleaginous cell factory *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2021, 118(10), 3640–3654. <https://doi.org/10.1002/bit.27859>
7. *Zhang Y., Nielsen J., Liu Z.* Engineering yeast metabolism for production of terpenoids for use as perfume ingredients, pharmaceuticals and biofuels. *FEMS Yeast Res.*, 2017, 17(8). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox080>
8. *Gao S., Tong Y., Zhu L., Ge M., Y. Zhang, Chen D., Jiang Y., Yang Sh.* Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous beta-carotene production. *Metab. Eng.*, 2017, 41, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.04.004>
9. *Larroude M., Celinska E., Back A., Thomas S., Nicaud J.-M., Ledesma-Amaro R.* A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene. *Biotechnol. Bioeng.*, 2018, 115(2), 464–472. <https://doi.org/10.1002/bit.26473>
10. *Wang N., Chi P., Zou Y., Xu Y., Xu S., Bilal M, Fickers P., Cheng H.* Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for thermoresistance and enhanced erythritol productivity. *Biotechnol. Biofuels*, 2020, 13, 176. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01815-8>
11. *Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E.* Molecular Cloning: Laboratory Manual, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. *Yuzbashev T., Yuzbasheva E., Melkina O., Patel D., Bubnov D., Dietz H., Ledesma-Amaro R.* A DNA assembly toolkit to unlock the CRISPR/Cas9 potential for metabolic engineering. 2022. <https://www.researchsquare.com/article/rs-1570357/v1>
13. *Blazcek J., Liu L., Redden H., Alper H.* Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(22), 7905–7914. <https://doi.org/10.1128/AEM.05763-11>
14. *Sabra W., Bommareddy R.R., Maheshwari G., Papanikolaou S., Zeng A.-P.* Substrates and oxygen dependent citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: insights through transcriptome and fluxome analyses. *Microb. Cell. Fact.*, 2017, 16(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0690-0>
15. *Taratynova M.O., Kosikhina Y.M., Vinogradova E.B., Dementev D.A., Korobov V.S., Zolotsev V.A., Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Sineoky S.P.* Accumulation of Neutral Lipids and β -Carotene by the *Yarrowia lipolytica* Yeast on a Medium with Sucrose as a Carbon Source. *Biotechnology*, 2021, 37, 29–41. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-3-29-41>
16. *Mohandesi N., Siadat S.O., Haghbeen K., Hesampour A.* Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* *SUC2* gene in yeast platform and characterization of recombinant enzyme biochemical properties. *3 Biotech*, 2016, 6(2), 129. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0441-7>

New pAraDH2 Promoter for Metabolic Engineering of the *Yarrowia lipolytica* Yeast

M. O. Taratynova^{a, #}, Yu. M. Fediayeva^a, D. A. Dementiev^a,
O. E. Melkina^a, T. V. Yuzbashev^b, S. P. Sineoky^a, and E. Y. Yuzbasheva^{c, d}

^aKurchatov Institute National Research Center, Moscow, 123182 Russia

^bPlant Sciences and the Bioeconomy, Rothamsted Research, West Common, Harpenden AL5 2JQ United Kingdom

^cBioMediCan Inc., 40471 Encyclopedia Circle, Fremont 94538 CA USA

^dBioKai Inc., 40471 Encyclopedia Circle, Fremont 94538 CA USA

[#]e-mail: mtaratynova@inbox.ru

Abstract—The ability to utilize a number of polyhydric alcohols as a sole carbon source has been studied in the *Y. lipolytica* yeast. The efficiency of the promoter of the *Yarrowia lipolytica* native *AraDH2* gene encoding the enzyme *D*-mannitol/*D*-arabitol dehydrogenase was assessed during yeast growth on a minimal medium with different carbon sources. For this purpose, the promoter region of the *AraDH2* gene was transcriptionally fused with the green fluorescent protein *hrGFP* gene, and the construct was used to transform *Y. lipolytica*. A β -carotene producing strain of *Y. lipolytica* was created using the described promoter; the strain carried the *Mucor circinelloides* *CarRP* and *CarB* genes encoding the bifunctional enzyme phytoene synthase/lycopene β -cyclase (*CarRP*) and phytoene dehydrogenase (*CarB*), as well as the *GGPPSs7* *Synechococcus* sp. gene encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase. The nucleotide sequence encoding the fused *CarRP* and *GGPPSs7* under the regulation of the pAraDH2 promoter and the *CarB* gene under the control of the pTEF promoter were introduced into the yeast genome. As a result, a transformant was obtained capable of producing 66.3, 121.2, and 148.9 mg/L of β -carotene after 5 days of cultivation in test tubes on media containing glycerol, sucrose, and glucose, respectively. The obtained results testify to the high potential of the pAraDH2 promoter in the field of genetic engineering.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, promoter, polyhydric alcohols, β -carotene, fluorescence analysis