

**УВЕЛИЧЕНИЕ СКОРОСТИ МЕТАБОЛИЗМА СОРБИТОЛА
НЕГАТИВНО ВЛИЯЕТ НА МЕТАНОЛ-ИНДУЦИРУЕМЫЙ
СИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ
В ДРОЖЖАХ *Komagataella kurtzmanii* И *Komagataella phaffii***

© 2024 г. Ф. И. Акентьев^{1, 2, *}, Д. Д. Соколова¹, И. И. Губайдуллин^{1, 2}, С. В. Рыков²,
О. В. Березина², Н. О. Черноморова², Е. Н. Элпидина³, Д. Г. Козлов¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²“Курчатовский геномный центр”, Национальный исследовательский центр
“Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: akentyevfil@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 01.11.2023 г.

Принята к публикации 13.02.2024 г.

Известно, что метаболизм сорбитола в дрожжах *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* ограничен уровнем экспрессии сорбитолдегидрогеназы. В настоящей работе получена серия трансформантов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, которые осуществляли синтез термостабильной эндоглюканазы Egh12 *Thielavia terrestris*, ксилоглюканазы Xgh12b *Aspergillus cervinus* и катепсина-L CathL *Tribolium castaneum* под контролем метанол-индуцируемого промотора P_{АОХ1}, и обладали различной скоростью метаболизма сорбитола за счет дополнительной экспрессии гена сорбитолдегидрогеназы. Секретию целевых ферментов исследовали на средах с содержанием метанола и сорбитола в разных соотношениях. Установлено, что повышение скорости метаболизма сорбитола у продуцентов оказывало негативное влияние на синтез целевых белков. В то же время низкоэффективное усвоение сорбитола этими штаммами, ограниченное уровнем экспрессии сорбитолдегидрогеназы или концентрацией сорбитола в среде, способствовало повышению секреции Egh12 и увеличению продукции фермента до 30% за счет стимулирования роста клеточной биомассы. Таким образом, оптимальное использование сорбитола в качестве дополнительного субстрата может приводить к увеличению рекомбинантной продукции ферментов модифицированными штаммами *K. kurtzmanii*, что может найти практическое применение при промышленном использовании таких продуцентов.

Ключевые слова: *Komagataella kurtzmanii*, сорбитол, дрожжи, индукция метанолом, рекомбинантные ферменты, метаболизм сорбитола

DOI: 10.56304/S0234275824010022

На базе дрожжей *Komagataella kurtzmanii*, относящихся к метилотрофным организмам, разработана система экспрессии генов [1, 2]. Как показала ее практическое использование, она представляет собой эффективную альтернативу широко распространенным коммерческим системам экспрессии на основе дрожжей *Komagataella phaffii* (ранее *Pichia pastoris*), обладая преимуществами в биосинтезе и секреции рекомбинантных белков и получении промышленно значимых ферментных препаратов [3, 4].

Список сокращений: КЖ – культуральная жидкость, SDH115 и SDH727 – гены сорбитолдегидрогеназы *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*, соответственно.

Для экспрессии целевых генов в дрожжах рода *Komagataella* часто применяют мощный индуцируемый метанолом промотор гена АОХ1 [5, 6]. В то же время индукция P_{АОХ1} репрессируется в присутствии большинства других, наиболее предпочтительных для дрожжей источников углерода, таких как глюкоза или глицерин [7]. Данная особенность заставляет, с целью повышения производительности продуцентов, разделять между собой этапы наращивания клеточной биомассы с использованием легко усваиваемых источников углерода и синтеза целевых продуктов в условиях индукции метанолом. Тем не менее, некоторые углеродные субстраты, к которым относится сорбитол, позволяют осуществлять эффективную индук-

Таблица 1. Плазмиды, сконструированные для экспрессии генов Egh12, Xgh12b и CathL в клетках *K. kurtzmanii* и *K. phaffii***Table 1.** Plasmids for expressing Egh12, Xgh12b, and CathL genes in *K. kurtzmanii* and *K. phaffii* cells

Название плазмиды	Кассета для экспрессии гена сорбитолдегидрогеназы	Целевой белок
pPH727_CathL***	–	
pPH727_CathL_SDH115	<i>SDH115</i> *	CathL
pPH727_CathL_SDH115_TA	<i>SDH115</i> **	
pPH727_Egh12	–	
pPH727_Egh12_SDH115	<i>SDH115</i> *	Egh12
pPH727_Egh12_SDH115_TA	<i>SDH115</i> **	
pPH727_Xgh12b	–	
pPH727_Xgh12b_SDH115	<i>SDH115</i> *	Xgh12b
pPH727_Xgh12b_(SDH115_TA)	<i>SDH115</i> **	

Примечание: *** – ранее плазмиду называли pPH727T2-rpTcCathL [17];

* – кассета *SDH115* содержала нативные промоторный P_{SDH115} и терминаторный T_{SDH115} элементы гена *SDH115* дрожжей *K. phaffii*;

** – в кассете *SDH115* вместо T_{SDH115} использован терминаторный элемент T_{AOX1} гена *AOX1* дрожжей *K. phaffii*.

Note: ***—the plasmid was previously called pPH727T2-rpTcCathL [17];

*—*SDH115* cassette contains the native promoter P_{SDH115} and terminator T_{SDH115} elements of the *SDH115* gene from yeast *K. phaffii*;

—in the *SDH115 cassette, the terminator element T_{AOX1} from the *AOX1* gene of yeast *K. phaffii* is used instead of T_{SDH115} .

цию метанолом одновременно со стимулированием роста клеточной биомассы за счет дополнительного субстрата [8, 9]. При этом, использование сорбитола при ферментации, способно вызывать ряд дополнительных положительных эффектов, к которым относятся увеличение синтеза рекомбинантных белков, снижение потребления метанола и кислорода, уменьшение клеточного стресса и снижение температуры во время ферментации, в результате чего снижаются затраты на охлаждение биореакторов при крупномасштабном производстве [8, 10–13].

Как было показано, дрожжи *K. kurtzmanii* в отличие от родственных *K. phaffii* не способны эффективно утилизировать сорбитол [1]. Сравнительное исследование показало, что лимитирующей стадией его метаболизма в дрожжах *K. kurtzmanii* является экспрессия гена сорбитолдегидрогеназы [14]. Увеличение числа копий этого гена в геноме *K. kurtzmanii* или *K. phaffii* позволила увеличить скорость роста дрожжей (μ_{max}) на среде с сорбитолом с 0 до 0.06 и с 0.02 до 0.06, соответственно. С учетом упомянутых выше положительных эффектов представлялось актуальным исследовать влияние этого соединения на продукцию рекомбинантных белков штаммами дрожжей с увеличенной скоростью роста на сорбитоле. С этой целью в качестве рекомбинантных белков были выбраны промышленно значимые ферменты: термостабильная эндоглюканаза Egh12 *Thielavia terrestris*, ксилоглюка-

наза Xgh12b *Aspergillus cervinus* и катепсин-L (CathL) *Tribolium castaneum* [15, 16]. Синтез и секрецию этих ферментов анализировали в клетках модифицированных штаммов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* с измененной скоростью метаболизма сорбитола, которые культивировали на средах, содержащих разные соотношения метанола и сорбитола.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Конструирование плазмид

Конструирование двухкассетных плазмид, содержащих целевые гены, проводили с использованием стандартных генно-инженерных процедур. Амплификацию плазмидных ДНК проводили в клетках штамма *E. coli* Top10 (Invitrogen, США), которые выращивали при 37°C в течение 18 ч в среде LB (1% триптон, 0.5% NaCl, 0.5% дрожжевой экстракт) с добавлением ампициллина до конечной концентрации 100 мкг/мл.

В дополнение к генам целевых белков, находившихся под контролем промотора *AOX1* дрожжей *K. kurtzmanii*, сконструированные двухкассетные плазмиды (табл.1) содержали ген *SDH115*, обеспечивавший синтез в клетках трансформантов сорбитолдегидрогеназы Sdh115 дрожжей *K. phaffii*. Секрецию прокатепсина CathL обеспечивала лидерная область artНН [2]. Секрецию зрелых целевых белков Egh12 и Xgh12b в клетках дрожжей направляла стандартная препрообласть

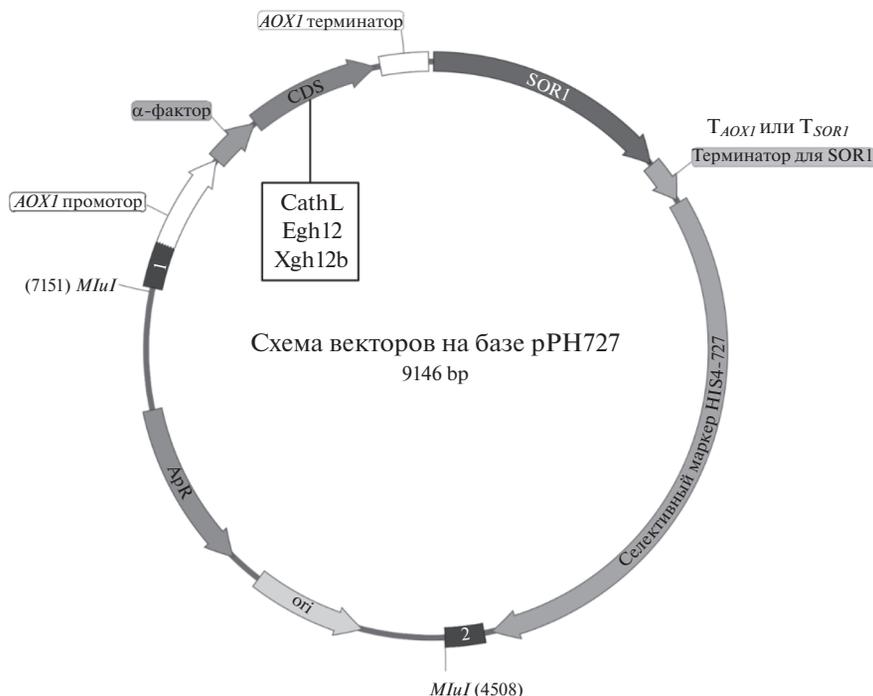


Рис. 1. Принципиальная схема плазмид, сконструированных в настоящей работе на базе вектора рРН727 [2] для экспрессии генов целевых белков CathL, Egh12 или Xgh12b. Перед трансформацией дрожжей плазмидные ДНК обрабатывали рестриктазой *MluI*, высвобождая из их состава интегративные фрагменты, содержащие целевые кассеты. Интеграцию кассет в дистальную часть промотора P_{AOX1} направляют области гомологии, обозначенные на схеме цифрами 1 и 2.

Fig. 1. Schematic diagram of plasmids constructed in this study based on the рРН727 vector [2] for expressing CathL, Egh12, or Xgh12b proteins. Prior to yeast transformation, plasmid DNAs were treated with *MluI* to release integrative fragments containing target cassettes. Integration of the cassettes into the distal part of the P_{AOX1} promoter is directed by the regions of homology indicated by numbers 1 and 2 in the diagram.

(https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf) α -фактора дрожжей *S. cerevisiae* (табл. 1).

Для получения плазмид рРН727_CathL_SDH115 и рРН727_CathL_SDH115_TA, вектор рРН727T2-рТсCathL [17] обрабатывали рестриктазами *AatII* и *BglIII* и получали фрагмент ДНК длиной 2756 н.п., который кодировал последовательность белка CathL, слитого с лидерной областью artНН. Векторы рРН727-SOR1(GS115) и рРН727-PAS_chr1-1_0490- T_{AOX1} , в последнем из которых терминация гена PAS_chr1-1_0490 (*SOR1*) осуществляется с помощью T_{AOX1} [14], обрабатывали теми же рестриктазами, затем проводили лигирование с полученным фрагментом ДНК, кодирующим последовательность CathL, в результате чего получали рРН727_CathL_SDH115 и рРН727_CathL_SDH115_TA соответственно.

Для конструирования рРН727_Egh12 вектор рPICZ α -Egh12 [15] обрабатывали по сайтам *HindIII* и *BamHI* и лигировали по этим же сайтам с частью базового вектора рРН727 [2] длиной 6348 н.п. Векторы рРН727_Egh12_SDH115 и рРН727_Egh12_SDH115_TA получали путем ли-

гирования трех фрагментов: фрагмент 1383 н.п. после обработки рPICZ α -Egh12 рестриктазами *HindIII* и *BamHI*, фрагмент промежуточного вектора 110-01 (Дополнительные материалы, рис. 1) длиной 1148 н.п. после обработки *AatII* и *HindIII* и фрагмент 6847 н.п. вектора рРН727-SOR1(GS115) или фрагмент 6684 н.п. рРН727-PAS_chr1-1_0490- T_{AOX1} соответственно, полученные после рестрикции этих векторов по сайтам *AatII* и *BglIII*. Аналогично конструировали плазмиды рРН727_Xgh12b, рРН727_Xgh12b_SDH115 и рРН727_Xgh12b_SDH115_TA с тем отличием, что вместо рPICZ α -Egh12 использовали рPICZ α -Xgh12b [15]. Общая схема полученных плазмид изображена на рис. 1.

Трансформация дрожжей

Для синтеза рекомбинантных ферментов использовали штаммы *K. phaffii* GS115 $\Delta his4$ (Invitrogen, США) и *K. kurtzmanii* Y-727 $\Delta his4$ (НИЦ "Курчатовский институт", Россия).

Плазмидные ДНК перед трансформацией обрабатывали рестриктазой *MluI*, после чего пересаживали на колонке Cleanup S-Cap (Кат. #BC041L,

“Евроген”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя (<https://evrogen.ru/products/isolation/cleanup>).

Подготовку компетентных клеток и их трансформацию проводили методом электропорации [18]. Трансформанты отбирали на минимальной селективной среде без гистидина YNBD следующего состава: Yeast nitrogen base с добавлением сульфата аммония (Amresco, США) — 6,7 г/л; глюкоза (Molekula Ltd., Великобритания) — 20 г/л; агар (Thermo Fisher Scientific, США) — 20 г/л.

Условия культивирования и оценка скорости роста

Трансформированные штаммы дрожжей выращивали в пробирках объемом 22 мл, содержащих 3 мл жидкой среды, с использованием роторного шейкера (CERTOMAT® BS-1, Sartorius, Германия) при температуре 30°C со скоростью перемешивания 250 об./мин. Для индукции метанолом свежие культуры штаммов ресуспендировали в стерильном буфере PBS, после чего одинаковый объем суспензии клеток засеивали в 3 мл жидкой среды YPGM (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон-140, 0.5% (v/v) глицерин, от 0.5% до 2% (v/v) метанол) или этой же среды с добавлением от 10 до 300 мМ сорбитола до конечной оптической плотности (OD_{600}) 0.5–1.0 и инкубировали 72 ч. Каждые 24 ч в пробирки вносили одинаковый объем метанола и сорбитола из исходных стоковых растворов с различной концентрацией до требуемой конечной концентрации в каждой пробирке (подробности указаны ниже). Оптическую плотность суспензий клеток измеряли в конце культивирования на спектрофотометре (UV mini 1240, Shimadzu, Япония) при длине волны $\lambda = 600$ нм в диапазоне поглощения от 0.15 до 0.7 используя одинаковую степень разведения для всех образцов. Все эксперименты по культивированию проводили трижды.

Анализ продукции и измерение ферментативной активности

Электрофорез белков, содержащихся в культуральной жидкости дрожжей, проводили в 15%-ном ДСН-ПААГ в денатурирующих условиях с использованием системы Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, США) согласно инструкции производителя (https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2144.pdf). В работе использовали окрашенные белковые маркеры (Арт. #26616, Thermo Fisher Scientific).

Активность фермента Egh12 определяли путем инкубации при 50°C аликвоты КЖ с 0.5% (m/v) раствором β -глюкана (P-BGVM, Megazyme, Ирландия) в 20 мМ натрий-ацетатном буфере с pH 4.6. Субстрат и исследуемые образцы перед началом реакции предварительно инкубировали при 50°C в течение 2 мин. Время реакции варьировали от 1

до 30 мин при условии линейной зависимости количества образующихся редуцирующих сахаров от времени. Количественное определение проводили с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты в соответствии с ГОСТ 31662-2012, для калибровки использовали стандартные растворы D-глюкозы, разведенные в соответствующей среде для культивирования. За одну единицу ферментативной активности (Ед) принимали 1 мкМ глюкозного эквивалента редуцирующих сахаров, образованных из субстрата за 1 мин.

Статистическая обработка данных

Каждое количественное значение усредняли по результатам, как минимум, трех независимых экспериментов. Для определения статистически значимых различий ($\alpha = 0.05$) применяли дисперсионный анализ. При сравнении значений экспериментальных выборок с контрольной группой использовали критерий Даннета ($\alpha = 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение трансформантов и отбор однокопийных клонов

Ранее было показано, что увеличения удельной скорости роста (μ_{max}) штаммов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* на минимальной среде с сорбитолом можно достичь путем интеграции в их геном последовательности гена сорбитолдегидрогеназы *SDH115 (SOR1)* *K. phaffii*. Причем использование в составе интегрируемого гена нативной промоторной области и терминатора T_{AOX1} обеспечивает повышение значения μ_{max} до 0.06 у *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*, а интеграция *SDH115* с полностью нативными промоторными и терминаторными регионами увеличивает μ_{max} до 0.02 у *K. kurtzmanii* [14].

В этой связи, с целью одновременного синтеза репортерных белков и изменения скорости усвоения сорбитола клетками дрожжей был сконструирован набор двухкассетных плазмид (табл. 1). Каждая двухкассетная плаزمида содержала уникальный набор генов, один из которых обеспечивал P_{AOX1} -зависимый синтез и секрецию целевого белка, а другой отвечал за изменение скорости усвоения сорбитола. Целевыми белками служили термостабильная эндоглюканаза Egh12 *Thielavia terrestris*, ксилотрансфераза Xgh12b *Aspergillus cervinus* и прокатепсин-L CathL *Tribolium castaneum* [15, 16].

Сконструированными плазмидами трансформировали реципиентные штаммы дрожжей *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, и полученные трансформанты (табл. 2) использовали для выращивания на средах с сорбитолом и метанолом для дальнейшего анализа продукции целевых белков.

После трансформации каждой из плазмид большинство отобранных клонов, как правило,

Таблица 2. Штаммы дрожжей, сконструированные в настоящей работе
Table 2. Yeast strains constructed in this study

Название штамма-производителя	Реципиентный штамм	Интегрированный вариант <i>SDH115</i>	Продуцируемый целевой белок	μ_{\max}^{***}
GS_CathL ₀₂	<i>K. phaffii</i>	–	CathL	0.02
GS_CathL ₀₆		<i>SDH115</i> **		0.06
GS_Egh12 ₀₂		–	Egh12	0.02
GS_Egh12 ₀₆		<i>SDH115</i> **		0.06
GS_Xgh12b ₀₂		–	Xgh12b	0.02
GS_Xgh12b ₀₆		<i>SDH115</i> **		0.06
Y_CathL	<i>K. kurtzmanii</i>	–	CathL	0
Y_CathL ₀₂		<i>SDH115</i> *		0.02
Y_CathL ₀₆		<i>SDH115</i> **		0.06
Y_Egh12		–	Egh12	0
Y_Egh12 ₀₂		<i>SDH115</i> *		0.02
Y_Egh12 ₀₆		<i>SDH115</i> **		0.06
Y_Xgh12b		–	Xgh12b	0
Y_Xgh12b ₀₂		<i>SDH115</i> *		0.02
Y_Xgh12b ₀₆		<i>SDH115</i> **		0.06

Примечание: * ** Обозначение, как в табл. 1.

*** Удельная скорость роста штамма на минимальной среде с сорбитолом, которая также отражена в названии штамма в виде индекса. $\mu = 2.3 (\lg X / \lg X_0) / t$, где μ – удельная скорость роста микроорганизмов ($ч^{-1}$); X_0 и X – начальная и конечная концентрация микробных клеток (КОЕ/см³); t – время культивирования микроорганизмов (ч).

Note: * ** Designation same as in Table 1.

*** Specific growth rate of the strain on minimal medium with sorbitol, which is also reflected in the name of the strain as an index. $\mu = 2.3 (\log X / \log X_0) / t$, where μ —specific growth rate of microorganisms (h^{-1}); X_0 and X —initial and final concentration of microbial cells (CFU/cm³); t —time of microorganisms cultivation (h).

демонстрировали одинаковый уровень секреции целевого белка. Однако, в ряде случаев в геном трансформанта интегрировалось, вероятно, более одной копии рекомбинантной ДНК, что соответствующим образом отражалось на продукции. В этой связи, для отбора заведомо однокопийных штаммов в каждом случае анализировали не менее 3 трансформантов, и для дальнейшей работы отбирали не менее 2 независимо полученных штаммов, показавших наименьшую продукцию белка (рис. 2). Для ПААГ-анализа использовали образцы КЖ, полученные в условиях индукции метанолом.

Как видно на рис. 2 в отсутствие в среде сорбитола трансформанты как *K. kurtzmanii*, так и *K. phaffii* демонстрировали сходный уровень продукции каждого белка. Однако при этом в каждом случае штаммы *K. kurtzmanii* оказывались заметно более эффективными продуцентами, чем соответствующие штаммы *K. phaffii*. Данный результат еще раз свидетельствовал в пользу высокой

конкурентоспособности системы экспрессии генов на базе дрожжей *K. kurtzmanii* по сравнению с прототипом на основе *K. phaffii*.

Синтез целевых белков на средах с различным соотношением метанола и сорбитола

Сконструированные штаммы (табл. 2) использовали для изучения влияния сорбитола на синтез целевых ферментов и рост биомассы дрожжей. С этой целью штаммы выращивали в течение 72 ч на комплексной среде YPGSM с исходной концентрацией сорбитола 300 мМ. Такой его избыток не оказывает негативного влияния на рост клеток *K. kurtzmanii*, что также было показано ранее и для *K. phaffii*. В то же время его концентрация остается достаточной для поддержания роста клеток в течение всего времени культивирования [10]. В качестве контроля штаммы без дополнительного гена *SDH* культивировали на среде YPGM без сорбитола. Индукцию во всех случаях прово-

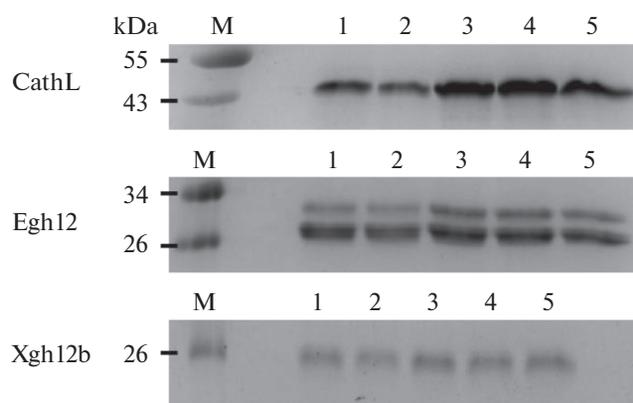


Рис. 2. ПААГ-анализ целевых белков, синтезированных трансформированными штаммами дрожжей в условиях индукции метанолом. На форец наносили образцы, содержавшие 10 мкл КЖ, штаммов-продуцентов. 1 – GS_CathL₀₂, 2 – GS_CathL₀₆, 3 – Y_CathL, 4 – Y_CathL₀₂, 5 – Y_CathL₀₆. Нумерация штаммов-продуцентов Egh12 и Xgh12b аналогичная.

Fig. 2. PAAG analysis of target proteins synthesized by transformed yeast strains under methanol induction conditions. Samples containing 10 μ l of culture medium of producing strains were applied to the electrophoresis. 1 – GS_CathL₀₂, 2 – GS_CathL₀₆, 3 – Y_CathL, 4 – Y_CathL₀₂, 5 – Y_CathL₀₆. The numbering of Egh12 and Xgh12b-producing strains is similar.

дили разным количеством метанола, который вносили каждые 24 ч до конечной концентрации от 0.5 до 2% (v/v), По окончании процесса измеряли оптическую плотность выращенных дрожжевых культур и активность Egh12 в КЖ соответствующих штаммов. Полученные результаты представлены в табл. 3 и на рис. 3 и 4.

Как как следует из результатов, представленных на рис. 3 и 4, штаммы *K. kurtzmanii* и *K. phaffii* имели разные профили индукции. Удельная продукция Egh12 клетками дрожжей *K. kurtzmanii* достигала максимума при индукции 1% (v/v) метанолом, в то время как максимум индукции *K. phaffii* был сдвинут в область больших его концентраций

Таблица 3. Оптическая плотность дрожжевых культур (OD₆₀₀), продуцентов Egh12, после 72 ч индукции различными концентрациями метанола.

Table 3. Optical density of yeast cultures (OD₆₀₀) producing Egh12 after 72 hours of induction with different concentrations of methanol.

Целевой белок	Штамм-продуцент	Наличие в среде сорбитола*	OD ₆₀₀			
			Концентрация метанола в среде**			
			0.5%	1%	1.5%	2%
Egh12	GS_Egh12 ₀₂	–	36 ± 2	53 ± 1	57 ± 1	67 ± 3
	GS_Egh12 ₀₂	+	92 ± 9	86 ± 1	81	79 ± 6
	GS_Egh12 ₀₆	+	100 ± 5	90 ± 1	86 ± 4	85 ± 2
Egh12	Y_Egh12	–	43 ± 4	55 ± 1	63 ± 5	70 ± 20
	Y_Egh12	+	71 ± 3	80 ± 1	75 ± 5	80 ± 20
	Y_Egh12 ₀₂	+	117 ± 8	82 ± 2	116 ± 7	77 ± 9
	Y_Egh12 ₀₆	+	123 ± 5	120 ± 20	102 ± 4	81 ± 7

Примечание: * Среда YPGSM содержала 300 мМ сорбитола.

** Указана расчетная концентрация (v/v), устанавливаемая в среде культивирования дрожжей YPGM за счет внесения метанола каждые 24 ч.

Note: * YPGSM medium contained 300 mM sorbitol.

** The calculated concentration (v/v) of methanol added to the YPGM yeast culture medium every 24 hours is indicated.

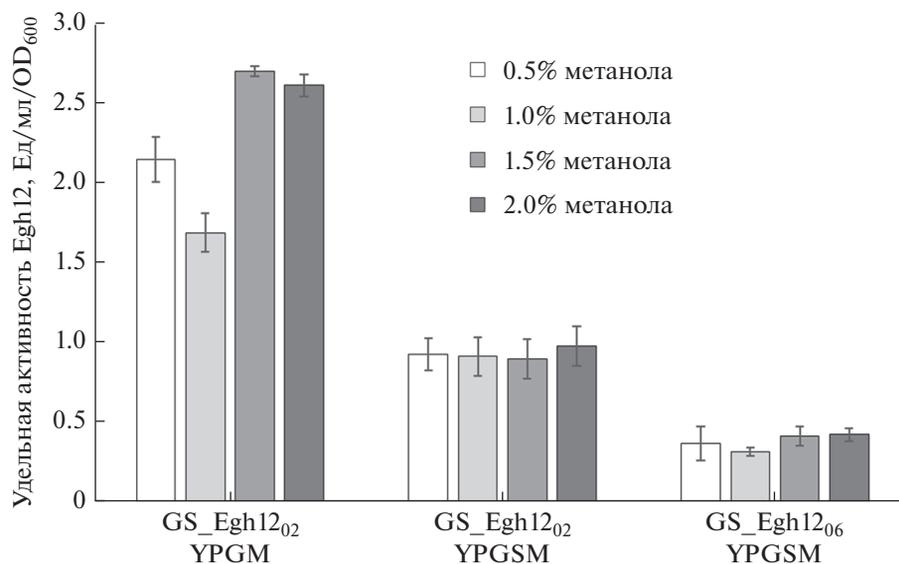


Рис. 3. Удельная активность Egh12 (Ед/мл/OD₆₀₀) в образцах КЖ штаммов-продуцентов *K. phaffii*. Названия штаммов и среда культивирования приведены внизу диаграммы. Синтез целевого фермента индуцировали метанолом, который вносили в среду до концентрации (v/v), указанной на рисунке. На диаграмме указаны стандартные ошибки среднего для каждого показателя.

Fig. 3. Specific activity of Egh12 (U/mL/OD₆₀₀) in culture medium samples of *K. phaffii* strains. Strain names and culture medium are given at the bottom of the diagram. Synthesis of the target enzyme was induced by methanol, which was added to the medium at concentrations (v/v) indicated in the figure. The chart shows the standard errors of the mean for each indicator

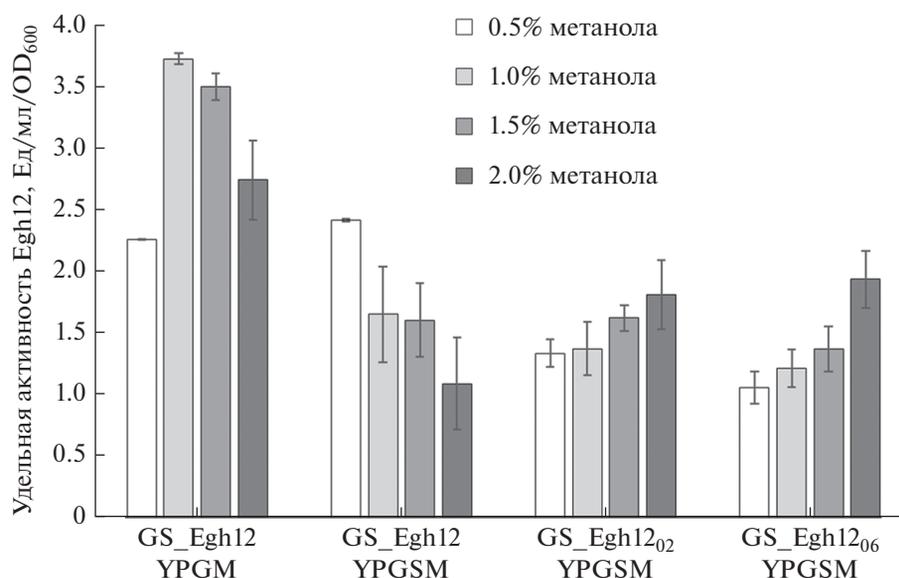


Рис. 4. Удельная активность Egh12 (Ед/мл/OD₆₀₀) в образцах КЖ штаммов-продуцентов *K. kurtzmanii*. Подробности эксперимента указаны в подписи к рис. 3.

Fig. 4. Specific activity of Egh12 (U/mL/OD₆₀₀) in samples of culture medium of *K. kurtzmanii* strains. Experimental details are indicated in the caption of Fig. 3.

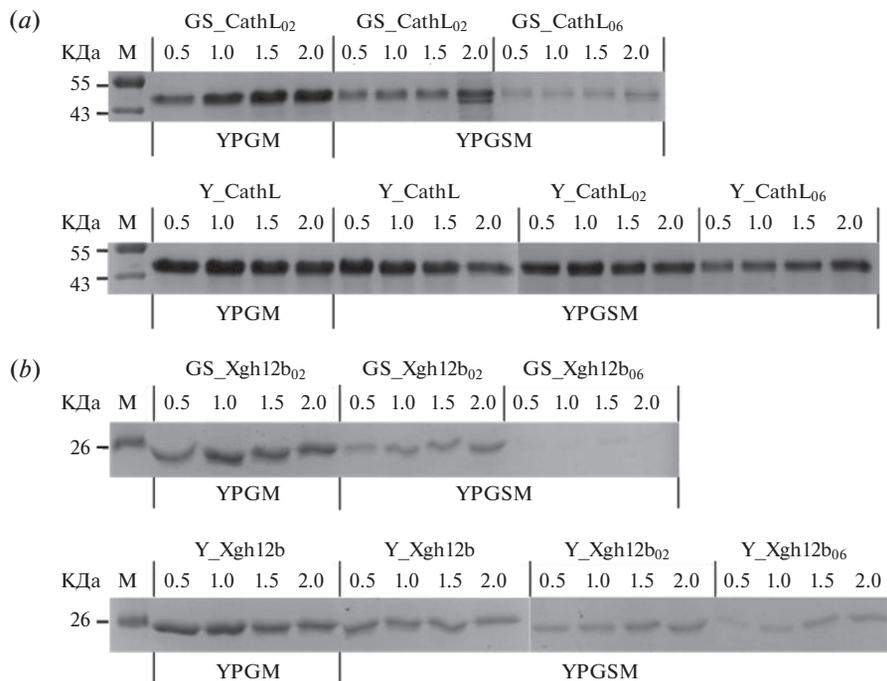


Рис. 5. Удельная продукция белков CathL (a) и Xgh12b (b) в КЖ штаммов дрожжей *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*. На форец наносили нормированные образцы КЖ, которые соответствовали 10 мкл КЖ каждой культуры с оптической плотностью $OD_{600} = 50$, полученные в результате 72 ч индукции метанолом. Метанол вносили в среду каждые 24 ч в концентрации 0,5, 1, 1,5 или 2% от объема культуры. Названия штаммов и среды указаны сверху и снизу от каждого изображения, соответственно. На диаграмме приведена характерная картина удельной продукции целевых белков в одном из экспериментов.

Fig. 5. Specific production of CathL (a) and Xgh12b (b) proteins in the culture medium (CM) of yeast strains *K. phaffii* and *K. kurtzmanii*. Normalized samples of CM were applied to the electrophoresis, corresponding to 10 μ L of CM from each culture with an optical density of $OD_{600} = 50$, resulting from 72 hours of methanol induction. Methanol was added to the medium every 24 hours at concentrations of 0.5, 1, 1.5, or 2% of the culture volume. The strain names and medium are indicated at the top and bottom of each image, respectively. The diagram shows the specific production of target proteins in one of the experiments.

(1.5–2%). При этом, в оптимальных условиях штамм *K. kurtzmanii* синтезировал в 1.4 раза большее количество Egh12 по сравнению с *K. phaffii* (рис. 3 и 4).

На среде YPGSM с сорбитолом оптические плотности исследуемых штаммов в конце культивирования ожидаемо превышали соответствующие показатели, достигавшиеся на не содержащей его среде (табл. 3, дополнительные материалы – табл. 2). Причем этот эффект был характерен, в том числе, для штаммов Y_CathL, Y_Egh12 и Y_Xgh12b, не получивших дополнительных копий гена *SDH*. Прирост оптической плотности этих штаммов на среде YPGSM был в 1.5–2 раза выше по сравнению с результатами контрольного культивирования на YPGM. (табл. 3, дополнительные материалы – табл. 2). Можно предположить, что крайне низкая экспрессия функционального гена *SDH727* в дрожжах *K. kurtzmanii* дикого типа, которой не достаточно для роста клеток на сорбитоле в условиях стандартного фенотипического теста, оказалась достаточной, чтобы обеспечить медленный рост

дрожжей в более благоприятных условиях длительного культивирования в жидкой среде [1, 14].

У всех штаммов-продуцентов Egh12, в геном которых были интегрированы дополнительные копии гена *SDH* удельная продукция фермента на среде YPGSM была снижена по сравнению с соответствующими значениями на контрольной среде без сорбитола. Так, например, показатели штамма GS_Egh12₀₂ дикого типа на среде с сорбитолом снижались всего в 2–3 раза, тогда как у штамма GS_Egh12₀₆ – уже в 5–7 раз (рис. 3). Данный эффект был характерен для продуцентов, полученных на базе обоих видов дрожжей *K. phaffii* и *K. kurtzmanii* (рис. 3 и 4). В то же время, в одном случае, этот эффект отсутствовал у штамма Y_Egh12, производного *K. kurtzmanii* без дополнительной копии *SDH*. При индукции 0.5% метанолом уровень удельного синтеза Egh12 этого штамма на обеих средах был одинаковым (рис. 4), хотя, очевидно, он был способен усваивать сорбитол, поскольку на содержащей его среде оптическая плотность была в 1.5 раза выше. Равенство показателей удельной продуктивности означает, что на среде с сорбитолом

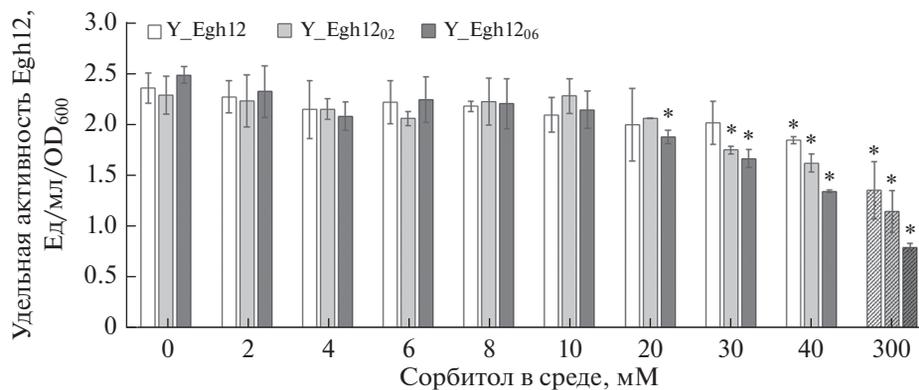


Рис. 6. Удельная активность Egh12 (Ед/мл/OD₆₀₀) в образцах КЖ штаммов *K. kurtzmanii* в зависимости от содержания сорбитола в среде. Названия штаммов указаны на диаграмме. Для сравнения на диаграмме приведены показатели этих же штаммов, полученные ранее на среде YPGSM с 300 мМ сорбитолом (рис. 4), который вносили однократно перед культивированием. Для всех диаграмм указано стандартное отклонение. Звездочками обозначены достоверные отличия между показателями штамма на среде с сорбитолом по сравнению с контрольным выращиванием без сорбитола (0 мМ).

Fig. 6. Specific activity of Egh12 (U/mL/OD₆₀₀) in culture medium samples of *K. kurtzmanii* strains depending on the sorbitol concentration in the medium. The strains are indicated in the diagram. For comparison, the chart shows the performance of the same strains obtained previously on YPGSM medium with 300 mM sorbitol (Figure 4), which was added once before culturing. Standard deviation is indicated for all diagrams. Asterisks indicate significant differences between strain parameters on medium with sorbitol compared to control cultivation without sorbitol (0 mM).

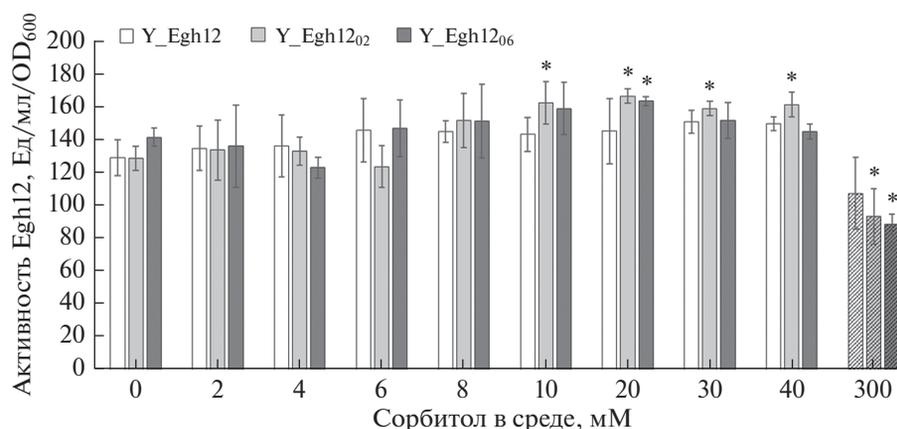


Рис. 7. Объемная активность Egh12 (Ед/мл) в образцах КЖ продуцентов на основе *K. kurtzmanii* в зависимости от содержания сорбитола в среде. Подробности эксперимента указаны в подписи к рис. 6.

Fig. 7. Volumetric activity of Egh12 (U/mL) in culture medium samples of *K. kurtzmanii*-based producers depending on the sorbitol content in the medium. Experimental details are indicated in the caption of Fig. 6.

дрожжи Y_Egh12 увеличили синтез Egh12 пропорционально приросту биомассы. Однако важно отметить, что такой эффект проявлялся только во время индукции 0.5% метанолом; при использовании более высоких концентраций индуктора удельная продуктивность штаммов на среде YPGSM снижалась.

Уровень продукции белков CathL и Xgh12b в КЖ исследуемых трансформантов оценивали методом ДСН-ПААГ. Как следует из результатов,

представленных на рис. 5, у трансформированных штаммов *K. phaffii* и *K. kurtzmanii* профили зависимости синтеза CathL и Xgh12b от уровня метанола в среде, аналогичные таковым для Egh12. Так, максимальные уровни синтеза этих ферментов достигались на среде YPGM без сорбитола. Добавление его в среду, как и увеличение скорости роста штаммов на такой среде, сопровождалось значительным снижением их удельной продуктивности (рис. 5). При этом максимумы удель-

ных показателей продуктивности у большинства трансформантов *K. kurtzmanii* соответствовали концентрациям метанола в среде 0.5–1.0%, в то время как у производных *K. phaffii* они были сдвинуты в область повышенных значений 1.5–2.0%.

Таким образом, согласно полученным результатам увеличение скорости роста штаммов *K. phaffii* и *K. kurtzmanii* на среде с сорбитолом в основном негативно влияло на их удельную продуктивность, независимо от особенностей секретируемых белков, использованных в качестве репортеров. В то же время, все указанные эффекты были обнаружены на среде с высокой концентрацией сорбитола (300 мМ), и они могли отражать его влияние на продуктивные свойства штаммов именно в этих условиях. В этой связи требовалось провести изучение продукции целевых белков сконструированными штаммами в более широком диапазоне концентраций сорбитола в среде.

Влияние концентрации сорбитола на продукцию Egh12

На основании изложенных выше результатов для оценки синтеза Egh12 в широком диапазоне концентраций сорбитола были выбраны штаммы *K. kurtzmanii*. Для культивирования этих штаммов, различавшихся скоростью роста в его присутствии, использовали набор сред YPGSM, в которые каждые 24 ч вносили сорбитол до его конечной концентрации в диапазоне от 0 до 40 мМ (рис. 6) и метанол до концентрации 1% (v/v).

Штаммы культивировали в течение 72 ч, после чего измеряли OD₆₀₀ и активность Egh12 в КЖ. Результаты измерений, представленные в виде удельной (Ед/мл/OD₆₀₀) и объемной (Ед/мл) активности, отражены на рис. 6 и 7, соответственно.

Как следует из результатов, представленных на рис. 6, достоверное снижение продуктивности исследуемых штаммов наблюдалось лишь на средах, содержащих 20 мМ сорбитола и более. При этом чем выше была скорость роста штамма на содержащей его среде, тем меньшая его концентрация требовалась для снижения продуктивности. Так, уменьшение удельной продукции штаммом Y_Egh12₀₆ наступало уже при внесении 20 мМ сорбитола, для Y_Egh12₀₂ – при 30 мМ, а для Y_Egh12 – при 40 мМ (рис. 6).

Увеличение объемной активности Egh12 в КЖ (Ед/мл) наблюдалось для штамма Y_Egh12₀₂ при концентрациях сорбитола от 10 до 40 мМ, а для Y_Egh12₀₆ при его регулярном добавлении до конечной концентрации 20 мМ. Наибольшую активность фермента определили для обоих штаммов Y_Egh12₀₂ и Y_Egh12₀₆ на среде, в которую ежедневно вносили 20 мМ сорбитола. Она составила 166 и 163 Ед/мл соответственно, что приблизительно на 30 и 15% превышало их показатели на

среде без этого дополнительного субстрата соответственно (рис. 7; дополнительные материалы – табл. 2 и 3).

Таким образом, можно сказать, что при использовании сорбитола в условиях индукции метанолом, любое увеличение экспрессии *SDH*, определяющее способность роста штаммов на содержащей его среде [14], как и его высокая концентрация (300 мМ) оказывали негативное влияние на удельные показатели продуктивности дрожжей *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*. При этом уровень репрессии напрямую зависел от интенсивности метаболизма сорбитола этими клетками. Это говорит о том, что он, как и другие источники углерода, вызывает репрессию промотора P_{AOX1}, хотя и не так выражено, как, например, глюкоза или глицерин. Важно также отметить, что зависимость синтеза белков от концентрации метанола может быть различной у штаммов одного и того же вида, которые отличаются только интенсивностью полиолового метаболизма.

Однако, когда в среду вносили различное количество сорбитола, удалось определить, что в некоторых условиях плотность клеточной биомассы и общее количество синтезированного репортерного белка для некоторых модифицированных штаммов с разным уровнем экспрессии сорбитолдегидрогеназы были выше, чем на контрольной среде. В этих условиях удельная продуктивность штаммов не снижалась, при этом наличие дополнительного субстрата стимулировало рост биомассы, что в итоге и привело к увеличению объемной продукции. Похоже, что положительные эффекты сорбитола, продемонстрированные ранее на дрожжах рода *Komagataella*, были обязаны относительно низкой скорости его метаболизма, где эффект репрессии P_{AOX1} был не столь выражен. Штаммы с ускоренным метаболизмом, полученные в текущей работе, наглядно продемонстрировали такой вид репрессии.

В то же время следует отметить, что сконструированные штаммы не только сохранили, но, возможно, даже расширили возможности по использованию сорбитола для ускорения роста дрожжей и увеличения их объемной продуктивности. В особенности это касается производных штамма *K. kurtzmanii*, которые, как показано в настоящей и предыдущих работах, превосходят *K. phaffii* в эффективности синтеза рекомбинантных белков. Поскольку оба аспекта имеют важнейшее биотехнологическое значение, применение модифицированных штаммов для рекомбинантного синтеза требует дальнейшего исследования, в особенности в условиях биореакторного культивирования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант № 075-15-2019-1659).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <https://sciencejournals.ru/journal/biotekh>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. Komagataella kurtzmanii sp. nov., a new sibling species of Komagataella (Pichia) pastoris based on multigene sequence analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 104(3), 339–47. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9956-7>
2. Matveeva A.Y., Gubaidullin I.I., Fedorov A.S., Kozlov D.G. Optimization of the Expression of 1,3-1,4- β -glucanase Gene from *Rhizomucor miehei* in the Komagataella kurtzmanii yeast. *Biotechnologiya*, 2019, 35(5), 3–11. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-3-11>
3. Gorbunov A.A., Akentyev F.I., Gubaidullin I.I., Zhiganov N.I., Tereshchenkova V.F., Elpidina E.N., Kozlov D.G. Biosynthesis and Secretion of Serine Peptidase SerP38 from *Tenebrio molitor* in the Yeast Komagataella kurtzmanii. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2021, 57(9), 917–924. <https://doi.org/10.1134/S0003683821090039>
4. Tereshchenkova V.F., Zhiganov N.I., Akentyev P.I., Gubaidullin I.I., Kozlov D.G., Belyaeva N.V., Filippova I.Y., Elpidina E.N. Preparation and Properties of the Recombinant *Tenebrio molitor* SerPH122—P. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2021, 57(5), 579–585. <https://doi.org/10.1134/S0003683821050161>
5. Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.*, 2000, 16(1), 23–52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>
6. Turkanoglu Ozcelik A., Yilmaz S., Inan M. *Pichia pastoris* Promoters. *Methods Mol. Biol.*, 2019, 1923, 97–112. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9024-5_3
7. Cregg J.M., Madden K.R., Barringer K.J., Thill G.P., Stillman C.A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell Biol.*, 1989, 9(3), 1316–23. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.3.1316-1323.1989>
8. Azadi S., Mahboubi A., Naghdi N., Solaimanian R., Mortazavi S.A. Evaluation of Sorbitol-Methanol Co-Feeding Strategy on Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Pichia Pastoris*. *Iran J. Pharm. Res.*, 2017, 16(4), 1555–1564.
9. Ergun B.G., Berrios J., Binay B., Fickers P. Recombinant protein production in *Pichia pastoris*: from transcriptionally redesigned strains to bioprocess optimization and metabolic modelling. *FEMS Yeast Res.*, 2021, 21(7). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab057>
10. Celik E., Calik P., Oliver S.G. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast*, 2009, 26(9), 473–84. <https://doi.org/10.1002/yea.1679>
11. Gao M.J., Zhan X.B., Gao P., Zhang X., Dong S.J., Li Z., Shi Z.P., Lin C.C. Improving Performance and Operational Stability of Porcine Interferon-alpha Production by *Pichia pastoris* with Combinational Induction Strategy of Low Temperature and Methanol/Sorbitol Co-feeding. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, 176(2), 493–504. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1590-6>
12. Niu H., Jost L., Pirlot N., Sassi H., Daukandt M., Rodriguez C., Fickers P. A quantitative study of methanol/sorbitol co-feeding process of a *Pichia pastoris* Mut(+)/pAOX1-lacZ strain. *Microb. Cell Fact.*, 2013, 12, 33. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-33>
13. Wang Z., Wang Y., Zhang D., Li J., Hua Z., Du G., Chen J. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation. *Bioresour. Technol.*, 2010, 101(4), 1318–1323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.025>
14. Akentyev P., Sokolova D., Korzhenkov A., Gubaidullin I., Kozlov D. Expression level of SOR1 is a bottleneck for efficient sorbitol utilization by yeast Komagataella kurtzmanii. *Yeast*, 2023. <https://doi.org/10.1002/yea.3884>
15. Rykov S.V., Selimzyanova A.I., Nikolaeva A.Y., Lazarenko V.A., Tsurin N.V., Akentyev P.I., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H., Berezina O.V. Unusual substrate specificity in GH family 12: structure-function analysis of glucanases Bgh12A and Xgh12B from *Aspergillus cervinus*, and Egh12 from *Thielavia terrestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, 106(4), 1493–1509. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11811-7>
16. Dvoryakova E.A., Vinokurov K.S., Tereshchenkova V.F., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Oppert B., Filippova I.Y., Elpidina E.N. Primary digestive cathepsins L of *Tribolium castaneum* larvae: Proteomic identification, properties, comparison with human lysosomal cathepsin L. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2022, 140, 103679. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103679>
17. Серкина А.В., Губайдуллин И.И., Акентьев Ф.И., Домбровский И.А., Филиппова И.Ю., Элпидина Е.Н., Козлов Д.Г., Булушова Н.В. Разработка основ технологии получения рекомбинантного катепсина L *Tribolium castaneum* в дрожжах Komagataella kurtzmanii. *Биотехнология*, 2022, 38(3), 22–34. <https://doi.org/10.56304/S0234275822030085>
18. Kumar R. Simplified protocol for faster transformation of (a large number of) *Pichia pastoris* strains. *Yeast*, 2019, 36(6), 399–410. <https://doi.org/10.1002/yea.3383>

Increased Rate of Sorbitol Metabolism Negatively Affects Methanol-induced Synthesis of Recombinant Enzymes in Yeast *Komagataella kurtzmanii* and *Komagataella phaffii*

P. I. Akentyev^{a, b, #}, D. D. Sokolova^a, I. I. Gubaidullin^{a, b}, S. V. Rykov^b, O. V. Berezina^b,
N. O. Chernomorova^b, E. N. Elpidina^c, and D. G. Kozlov^a

^aNational Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^b“Kurchatov Genomic Centre”, National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^cA.N. Belozersky Research Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

[#]e-mail: akentyevfil@gmail.com

Abstract—It is known that sorbitol metabolism in yeast *K. kurtzmanii* and *K. phaffii* is limited by the level of sorbitol dehydrogenase expression. In the present work, we obtained transformants of *K. kurtzmanii* and *K. phaffii* that synthesized the thermostable endoglucanase Egh12 of *Thielavia terrestris*, xyloglucanase Xgh12b of *Aspergillus cervinus* and cathepsin-L CathL of *Tribolium castaneum* under the control of the methanol-inducible promoter P_{AOXI}, and had different rates of sorbitol metabolism due to additional expression of the sorbitol dehydrogenase gene. Synthesis and secretion of the target enzymes were investigated on media containing methanol and sorbitol in different ratios. The results obtained showed that an increase in the rate of sorbitol metabolism in the producers had a negative effect on the synthesis of target proteins up to complete inhibition of their production. At the same time, low-efficiency sorbitol assimilation by these strains, limited by the expression of sorbitol dehydrogenase or by the concentration of sorbitol in the medium, promoted an increase in the secretion of Egh12 and increased the enzyme production up to 30% by stimulating the growth of cell biomass.

Keywords: *Komagataella kurtzmanii*, sorbitol, yeast, methanol induction, recombinant enzymes, sorbitol metabolism