

ВЛИЯНИЕ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА *OPI1* НА ПРОДУКЦИЮ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ФИТАЗЫ И β -АМИЛАЗЫ В *Komagataella phaffii*

© 2024 г. А. А. Ткаченко¹*, Л. Н. Борщевская¹, С. П. Синецкий¹, Т. Л. Гордеева¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

*e-mail: artur.tka4enko10@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2024 г.

После доработки 02.07.2024 г.

Принята к публикации 03.08.2024 г.

Получен новый штамм-реципиент *Komagataella phaffii* ВКПМ Y-5229 ($\Delta his4\Delta Opi1$), использование которого позволяет конструировать штаммы с повышенной продукцией рекомбинантных белков. Выявлен ген *OPI1*, кодирующий транскрипционный регулятор *Opi1* – функциональный аналог негативного регулятора биосинтеза липидов *Opi1p* из *Saccharomyces cerevisiae*. Нокаут гена *OPI1* в штамме *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 ($\Delta his4$) проведен с использованием высокоэффективной системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Исследовано влияние инактивации гена *OPI1* на продукцию рекомбинантных гетерологичных ферментов: фитазы *Citrobacter gillenii* и β -амилазы *Priestia flexa*. Средняя продуктивность трансформантов на основе штамма ВКПМ Y-5229 ($\Delta his4\Delta Opi1$), секретирующих фитазу или β -амилазу, повысилась на 18 и 25% соответственно по сравнению с продуктивностью трансформантов, полученных на основе родительского штамма. Также показано, что инактивация гена *OPI1* в многокопийном штамме-производителе фитазы *C. gillenii* приводит к увеличению его продуктивности более чем на 26%. Полученные результаты могут быть использованы для конструирования промышленных штаммов-производителей гетерологичных белков на основе *K. phaffii*, а также для повышения продукции гетерологичных белков в существующих штаммах-производителях.

Ключевые слова: *Komagataella phaffii*, CRISPR/Cas9, *Opi1*, гетерологичные белки, продуктивность

DOI: 10.56304/S0234275824040112

В настоящее время метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* – широко используемая эукариотическая экспрессионная система для биотехнологического производства большого спектра гетерологичных белков, в том числе промышленных ферментов.

Фитазы и β -амилазы относятся к ценным промышленным ферментам и производятся микробиологическим способом [1, 2]. Фитазы (ЕС 3.1.3.26) гидролизуют фитат с отщеплением неорганического фосфата и с успехом применяются в сельском хозяйстве для увеличения питательности кормов для животных. β -амилаза (ЕС 3.2.1.2) представляет собой экзофермент, который катализирует гидролиз второй α -1,4-гликозидной связи в крахмале с невозстанавливающего конца, высвобождая мальтозу. β -амилазы применяют в пивоварении, а также для производства мальтозных

сиропов, которые широко используют в кондитерской и пищевой промышленности [3].

Для конструирования высокопродуктивных штаммов применяют различные подходы к увеличению экспрессии целевых генов и секреции гетерологичных белков, такие как использование синтетических последовательностей генов, оптимизированных по составу кодонов [4, 5], под контролем сильных промоторов, и увеличение в хромосоме штамма числа копий гена [6, 7], кодирующего целевой белок. Однако увеличение копийности целевого гена не всегда приводит к повышению продуктивности штамма. Избыточная экспрессия рекомбинантных белков может перегружать секреторный механизм клетки *K. phaffii*, вследствие чего в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭР) накапливаются неправильно свернутые белки. В результате возникает клеточный стресс, который запускает систему ответа на несвернутый белок (unfolded protein response, UPR) [8].

ЭР обладает ограниченной способностью к фолдингу рекомбинантных белков и, таким образом, является важной мишенью для клеточной инженерии – с целью повышения выхода целевого белка [9]. Несвернутые или неправильно свер-

Список сокращений: PAM (protospacer adjacent motif) – мотив, расположенный рядом с протоспейсером; sgPНК – единая направляющая PНК; UPR (unfolded protein response) – ответ на несвернутый белок; КЖ – культуральная жидкость; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

нутые белки удаляются из клетки по пути ЭР-ассоциированной деградации (endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, ERAD), что снижает конечный выход целевого продукта [10].

К распространенным подходам для повышения эффективности фолдинга и процессинга гетерологических белков в ЭР с целью увеличения их секреции в *K. phaffii* относится сверхэкспрессия генов, кодирующих белки, участвующие в UPR. Это активатор транскрипции генов UPR, Hac1p, или шапероны и фолдазы: например, Kar2p, Pdi1 или Ero1p [11]. Однако такой подход не всегда успешен, так как продуктивность белка иногда снижается из-за несбалансированной работы UPR [12].

Ранее сообщалось, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* во время работы UPR происходит расширение мембраны ЭР, которое зависит от процесса биосинтеза липидов [13]. Следовательно, расширение пространства ЭР в клетках штаммов-реципиентов — перспективная стратегия для предотвращения негативных последствий клеточного стресса, связанного со сверхэкспрессией белка, и сопутствующей индукции UPR.

Ранее J. de Ruijter с соавт. [14] показали, что делеция гена *OPII*, кодирующего белок Opi1p в дрожжах *S. cerevisiae*, приводит к увеличению размера ЭР и, как следствие, к повышению продукции рекомбинантного иммуноглобулина G в этих клетках.

Цель работы заключалась в исследовании влияния инактивации гена *OPII* на продуктивность трансформантов *K. phaffii*, секретирующих гетерологические белки: фитазу и β -амилазу.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы

Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза были получены от компании “Диа-М” (Россия), все ферменты для молекулярных работ — от фирмы Thermo Fisher Scientific (США), фитат натрия и мальтоза — от Sigma-Aldrich (США), соли и другие реагенты (все реактивы отечественного производства марки х. ч. или ч. д. а.) — от фирмы “Химмед” (Россия).

Штаммы и среды

Для стандартных генно-инженерных работ (конструирование плазмид, наработка плазмидной ДНК) использовали штамм *Escherichia coli* XL-1 Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac⁺ZΔM15 Tn10 (Ter^r)]*) ВКПМ В-5667. Культуру растили при 37°C в среде LB, г/л: триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 10; — при необходимости добавляли ампициллин или канамицин (Sigma-Aldrich) в концентрации 100 или 50 мкг/мл соответственно.

Штамм-реципиент *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 (*Δhis4*) и штамм-продуцент фитазы *K. phaffii* ВКПМ Y-5127 получены и описаны нами ранее [15]. Культуру дрожжей *K. phaffii* растили при 30°C на среде YPD, г/л: пептон — 10, дрожжевой экстракт — 10, глюкоза — 20.

Отбор трансформантов, несущих в составе хромосомы ген *amyPf*, кодирующий β -амилазу из бактерии *Priestia flexa*, или ген *phyCg-op*, кодирующий фитазу из бактерии *Citrobacter gillenii*, проводили с использованием минимальной среды без содержания аминокислот YNB (HiMedia, Индия). В качестве источника углерода в среду добавляли глюкозу в количестве 2 мас. %.

Селекцию трансформантов, содержащих эписомальную плазмиду для инактивации гена *OPII*, проводили на агаризованной среде YPD с добавлением селективного агента генетицина (G418) (Thermo Fisher Scientific) в количестве 600 мкг/мл. Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/л.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей были использованы программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и NCBI ORF Finder tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Для поиска консервативных доменов использован интерфейс CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Конструирование эписомальной плазмиды для инактивации гена *OPII* и получение штамма *K. phaffii* ER1 (*Δhis4Δopi1*)

Инактивацию гена *OPII* проводили с использованием системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. Для дизайна единой направляющей РНК (sgРНК) использовали опубликованную ранее методику [15]. Подбор спейсерной последовательности, состоящей из 20 нуклеотидов (5'-cgctcggcagcagcaggaga-3'), проводили с использованием программы СНОРСНОР [16]. Фрагмент ДНК, кодирующий sgРНК, был синтезирован в компании “Евроген” (Россия). На 5'- и 3'-концах нуклеотидной последовательности были предусмотрены сайты рестрикции *BpiI*.

Эписомальную экспрессионную плазмиду с sgРНК для инактивации гена *OPII* конструировали на основе экспрессионного вектора ВВ3сК_pGAP_23*_pTEF_Cas9 (Addgene, США) [17]. Фрагмент ДНК, кодирующий sgРНК, клонировали в вектор ВВ3сК_pGAP_23*_pTEF_Cas9 по сайтам *BpiI*. В результате была получена плазида pGAP-sgRNA_опi1-pTEF-Cas9-Km.

Плазмиду трансформировали в штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 ($\Delta his4$) методом электропорации, как описано ранее [18]. Селекцию трансформантов проводили на агаризованной среде YPD с добавлением генетицина в течение 3 сут при температуре 30°C. Для инактивации гена *OPI1* отобранные трансформанты дважды пересевали на среде YPD с добавлением генетицина.

Инактивацию гена *OPI1* в полученных трансформантах подтверждали секвенированием с использованием праймеров Opi1-seq-F и Opi1-seq-R (табл. 1).

Выщепление эписомальной плазмиды из дрожжевых клеток проводили путем двукратных пересевов на среде YPD без селективного давления. В результате получен штамм *K. phaffii* ER1 ($\Delta his4\Delta opi1$), депонированный в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ “Курчатовский институт” под номером ВКПМ Y-5229.

Конструирование интегративной экспрессионной плазмиды *pRIC9-bAmy*

Плазмиду *pRIC9-bAmy* конструировали на основе интегративного экспрессионного вектора *pRIC9* (Invitrogen, США). Ген *amyP* синтезировали методом ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК бактерий *P. flexa* ВКПМ В-13014 и специфические праймеры *b-AmyPf-F* и *b-AmyPf-R* (табл. 1). На 5'- и 3'-концах нуклеотидной последовательности были предусмотрены сайты рестрикции *EcoRI* и *NotI* для клонирования в вектор *pRIC9*. В результате была получена экспрессионная плаزمида *pRIC9-bAmy*.

Выделение геномной ДНК проводили с использованием комплекта реагентов ДНК-экспресс (“Синтол”, Россия). Для выделения и очистки ПЦР-продуктов использовали набор GeneJET Gel Extraction Kit (#K0692; Thermo Fisher Scientific). Все стандартные гено-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, лигирование, трансформация клеток *E. coli*) проводили по классическим протоколам [19].

Получение трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5229, продуцирующих фитазу из *S. gillenii* и β -амилазу из *P. flexa*

Плазмиду *pRIC9-PhyCg-op*, содержащую ген, кодирующий фитазу *S. gillenii*, и полученную ранее на основе вектора *pRIC9* [20], а также плазмиду *pRIC9-bAmy* лианеризовали эндонуклеазой рестрикции *BglII*, получали интегративные экспрессионные кассеты *pCIT-His* и *bAmy-His*, которые трансформировали в клетки штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5229 методом электропорации, как описано ранее [18]. Транс-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе
Table 1. Primers used in this study

Праймер	Последовательность (5' → 3')
Opi1-seq-F	tggcaacgaaatctagtcatag
Opi1-seq-R	gtaaaactgagttgcccag
PhyCg-op-F	gacgaacaatctggtatgcaatt
PhyCg-op-R	ttacttttcagcacattcgct
b-AmyPf-F	gcggtaaatggacagtcggt
b-AmyPf-R	ttaccaattattcgatatacgtt

форманты отбирали по способности расти на среде YNB с добавлением 2 мас.% глюкозы.

Наличие экспрессионной кассеты *pCIT-His* в составе хромосомы трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5229 подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров *PhyCg-op-F* и *PhyCg-op-R*, а экспрессионной кассеты *bAmy-His* – с использованием праймеров *b-AmyPf-F* и *b-AmyPf-R* (табл. 1).

Условия ферментации дрожжевых штаммов

Посевную культуру (инокулят) получали выращиванием трансформантов в течение 24 ч при 30°C и 250 об/мин в жидкой питательной среде YPD. Затем трансформанты засеивали инокулятом в соотношении 1/10 в среду YPD с содержанием глюкозы 1 мас.% и растили в течение 24 ч при 30°C и перемешивании со скоростью 250 об/мин. Далее проводили культивирование в течение 48 ч, добавляя метанол в количестве 1% от объема культуральной жидкости (КЖ) каждые 24 ч. После ферментации отбирали аликвоты, КЖ центрифугировали при 14000 g в течение 5 мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) и проводили анализ супернатантов на наличие фитазной или β -амилазной активности.

При исследовании ростовых характеристик ночные культуры исследуемых штаммов инокулировали с начальной оптической плотностью 0.1 при длине волны 600 нм (A_{600}) в жидкую среду YPD и растили в течение 24 ч при 30°C. Поглощение КЖ измеряли на спектрофотометре VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, США).

Все измерения проводили в трех независимых повторах.

Определение фитазной и β -амилазной активности

Определение фитазной активности проводили с помощью модифицированного метода Фиске–Субарроу [21], как описано в работе [20].

Стандартное определение β -амилазной активности проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мкл 2%-ного раствора субстрата

(крахмала) в 0.5 М Трис-НСl (рН 8.0) и 50 мкл образца фермента. Смесь инкубировали в течение 10 мин при 55°C. Редуцированные сахара определяли ДНС-методом (с использованием реактива 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС) и мальтозы в качестве стандарта) [22].

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы MS Excel 2016. Средние значения показателей сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск функционального аналога белка *Opi1p* *S. cerevisiae* в дрожжах *K. phaffii*

Белок *Opi1p* – негативный регулятор биосинтеза липидов в дрожжах *S. cerevisiae*, который участвует в регуляции липидного обмена, и его основной мишенью является Ino2p/Ino4p-комплекс. Ino2p и Ino4p – факторы транскрипции, которые индуцируют транскрипцию многих ферментов синтеза фосфолипидов. Комплекс Ino2p/Ino4p играет ключевую роль в контроле размера ЭР, а удаление репрессора *Opi1p* приводит к увеличению ЭР у *S. cerevisiae* примерно в 1.5 раза по сравнению с размером ЭР штаммов дикого типа [13].

Поиск функционального аналога белка *Opi1p* *S. cerevisiae* в дрожжах *K. phaffii* проводили путем гомологичного выравнивания его аминокислотной последовательности с референсными последовательностями белков *K. phaffii* GS115 из базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В результате поиска в дрожжах *K. phaffii* обнаружена аминокислотная последовательность *Opi1* (XP_002489672.1) размером 388 а.о., на 26% гомологичная последовательности белка *Opi1p* *S. cerevisiae*. На основе поиска консервативного домена, характерного для суперсемейства *Opi1*, выявленный белок предположительно идентифицирован как транскрипционный фактор *Opi1*, участвующий в биосинтезе фосфолипидов. Функциональную классификацию выявленного белка проводили путем сравнения архитектуры доменов подсемейств, представленных в базе данных консервативных доменов (CDD) NCBI, с использованием интерфейса CD-Search. В аминокислотной последовательности исследуемого белка в области N236–W359 обнаружен домен, характерный для семейства консервативных белковых доменов *Opi1*, суперсемейства pfam08618.

В базе данных GenBank найдена нуклеотидная последовательность гена *OPI1* (XM_002489627.1) размером 1167 п.н., кодирующая белок *Opi1* *K. phaffii*.

Получение штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5229 с инактивированным геном *OPI1*

Инактивацию гена *OPI1* проводили в ауксотрофном штамме *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 (*Δhis4*), полученном нами ранее [15]. Для инактивации гена *OPI1* была сконструирована эписомальная плаزمида pGAP-sgRNA_опi1-pTEF-Cas9-Km, содержащая sgРНК, нацеливающую нуклеазу Cas9 на кодирующую последовательность гена *OPI1*, под контролем GAP-промотора, а также кодоноптимизированную последовательность гена *cas9* из *Streptococcus pyogenes*, встроенную в единую рамку считывания с нуклеотидной последовательностью сигнала ядерной локализации большого Т-антигена SV40, под контролем дрожжевого TEF-промотора и CYC1-терминатора. Плазмиду трансформировали в клетки штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5013. Трансформанты отбирали на среде с генетицином.

Подтверждение инактивации гена *OPI1* в отобранных трансформантах проводили секвенированием области, в которой при воздействии нуклеазы Cas9 должна была произойти мутация, приводящая к нарушению рамки считывания кодирующей последовательности и утрате функциональной активности белка *Opi1*. Результаты представлены на рис. 1.

В результате секвенирования фрагмента гена *OPI1* выявлено наличие делеций в 6 из отобранных 10 трансформантов. Таким образом, эффективность инактивации гена *OPI1* с помощью CRISPR/Cas9-системы составила 60%.

Для дальнейшей работы был выбран штамм *K. phaffii* ER1 (*Δhis4Δopi1*). Выщепление эписомальной плазмиды из клеток штамма проводили путем двукратных пересевов на среде YPD без селективного давления. Штамм был депонирован в БРЦ ВКПМ НИЦ “Курчатовский институт” под номером ВКПМ Y-5229.

Изучение ростовых характеристик штамма Y-5229

Ростовые характеристики штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5229 сравнивали с таковыми для родительского штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5013. Проведено сравнение уровня накопления биомассы за 24 ч в среде YPD путем измерения поглощения КЖ исследуемых штаммов при длине волны 600 нм. Результаты измерений представлены на рис. 2.

Как видно из полученных данных, уровень накопления биомассы штаммом *K. phaffii* ВКПМ Y-5229 относительно родительского штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 изменился незначительно, что свидетельствует о высокой специфичности и низкой нецелевой активности разработанной sgРНК, с использованием которой был получен штамм. Введенная мутация, по-видимому, не оказывает существенного влияния на физиологию

OPI1 wild type 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAGGAGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER1 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAG–AGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER2 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAGGAGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER3 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGA–AGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER4 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAGG–GACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER5 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAG–AGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER6 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAGGAGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER7 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAG–AGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER8 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAGGAGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER9 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAGGAGACCGGTGACGAC–3'
 Δ *OPI1* clon ER10 5' –CGTAGAGTTACGTCGGCAGCAGCGAG–AGACCGGTGACGAC–3'

Рис. 1. Результаты секвенирования фрагмента гена *OPI1* полученных трансформантов. Двадцатинуклеотидная последовательность ДНК-мишени выделена серым цветом, сайт PAM – подчеркиванием.

Fig. 1. Sequencing of the *OPI1* gene fragment in transformants obtained. The sequence of 20 nucleotides of the target DNA is highlighted in gray, the PAM site is underlined.

клетки и не создает серьезных препятствий для использования штамма в качестве реципиента для получения продуцентов гетерологичных белков.

Влияние инактивации гена *OPI1* на продукцию гетерологичных белков

Влияние инактивации гена *OPI1* на уровень продукции гетерологичных белков оценивали путем сравнения средней продуктивности трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5229, секретирующих репортерные ферменты фитазу из *C. gillanii* и β -амилазу из *P. flexa*. Выбор фитазы *C. gillanii* был основан на ранее полученных нами данных, опубликованных в работе [20], где показано, что ген *phyCg-op*, кодирующий эту фитазу, эффективно экспрессируется в *K. phaffii*. Ген *amyPf*, кодирующий β -амилазу *P. flexa*, ранее не был экспрессирован в *K. phaffii*. Однако этот фермент обладает промышленно ценными свойствами, поэтому конструирование штамма-продуцента β -амилазы представляет практический интерес [23].

Гены *amyPf* и *phyCg-op* были клонированы в состав экспрессионного вектора pPIC9 под контролем индуцибельного промотора PAOX1. Для секреции фермента в КЖ в векторе предусмотрена нуклеотидная последовательность сигнального пептида α -фактора дрожжей *S. cerevisiae*, а для отбора трансформантов – дрожжевой селективный маркер PpHIS4.

Плазмиды pPIC9-PhyCg-op и pPIC9-AmyPf лиа-неризовали эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и получали экспрессионные кассеты pCIT-His (рис. 3a) и bAmy-His (рис. 3b).

Кассеты трансформировали в клетки штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5229 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5013. Затем случайным образом отбирали по 10 ПЦР-

положительных трансформантов каждого штамма и проводили их ферментацию. После ферментации измеряли фитазную и β -амилазную активности трансформантов в КЖ, а также оптическую плотность КЖ. На основании полученных данных определяли среднюю продуктивность трансформантов исследуемых штаммов относительно накопленной биомассы. Результаты приведены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, относительная продуктивность трансформантов, секретирующих фитазу и β -амилазу, полученных на основе штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5229, превы-

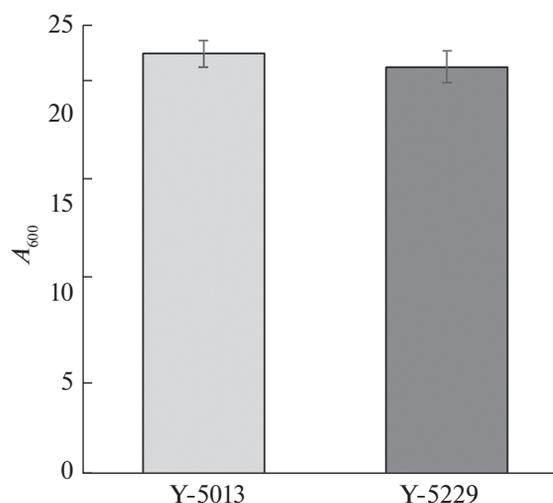


Рис. 2. Накопление клеточной биомассы штаммами *K. phaffii* за 24 ч при 30°C. Приведены средние значения трех независимых экспериментов. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение.

Fig. 2. Accumulation of biomass by *K. phaffii* strains in 24 h at 30°C. The average values of three independent experiments are given. The error bars reflect the standard deviation.

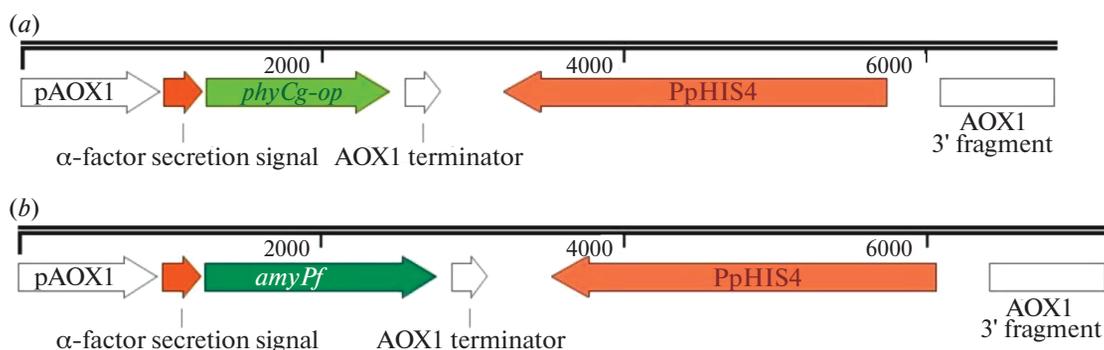


Рис. 3. Схематическое изображение интегративных экспрессионных кассет. *a* – Кассета pCIT-His; *b* – кассета bAmy-His. α -factor secretion signal – сигнал секреции α -фактора; terminator – терминатор; 3' fragment – 3'-фрагмент.
Fig. 3. Schematic representation of integrative expression cassettes. *a* – pCIT-His cassette; *b* – bAmy-His cassette.

шает такую для трансформантов родительского штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 более чем на 18% и 25% соответственно. Таким образом, инактивация гена *OPI1* в штамме-реципиенте *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 привела к повышению продуктивности получаемых на его основе трансформантов, секретирующих как фитазу, так и β -амилазу.

Далее изучали влияние инактивации гена *OPI1* на продуктивность многокопийного штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5127 – продуцента фитазы, который был получен ранее [15]. Этот штамм характеризуется усиленной экспрессией гена *phyCg-op* и повышенной продукцией рекомбинантной фитазы. Предполагается, что инактивация гена *OPI1* может также влиять на размер ЭР в *K. phaffii*, что, вероятно, положительно скажется на фолдинге рекомбинантной фитазы и тем самым увеличит ее выход.

Для инактивации гена *OPI1* в клетки штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5127 трансформировали ранее полученную эписомальную плазмиду pGAP-sgRNA_ori1-pTEF-Cas9-Km и отбирали трансформанты на среде с генетицином. Выщепление эписомальной плазмиды из клеток и отбор трансформанта с инактивированным геном *OPI1* проводили, как описано выше. В результате был полу-

чен штамм *K. phaffii* FD1 (*Δopi1*). Культивирование этого и родительского штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5127 проводили в трех повторах. В конце ферментации измеряли оптическую плотность КЖ, клетки осаждали центрифугированием, а супернатант анализировали на наличие фитазной активности. На основании полученных данных определяли среднюю продуктивность исследуемых штаммов относительно накопленной биомассы. Результаты представлены в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, инактивация гена *OPI1* в многокопийном штамме-продуценте фитазы *K. phaffii* ВКПМ Y-5127 позволила увеличить его продуктивность более чем на 26% относительно уровня накопленной биомассы по сравнению с контрольным штаммом.

Таким образом, в результате проведенного исследования продемонстрировано положительное влияние инактивации гена *OPI1* в дрожжах *K. phaffii* на продукцию гетерологичных белков на примере фитазы и β -амилазы. Новый штамм-реципиент *K. phaffii* ВКПМ Y-5229 позволит получать безмаркерные продуценты гетерологичных белков с повышенной продуктивностью. Механизм влияния инактивации гена *OPI1* в *K. phaffii* на повышение продукции гетерологичных белков представля-

Таблица 2. Продуктивность трансформантов исследуемых штаммов
Table 2. Productivity of transformants of the studied strains

Репортерный фермент	Штамм-реципиент <i>K. phaffii</i>	Средняя продуктивность трансформантов*, $U \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{о.е.}^{-1}$	Уровень значимости, <i>p</i>	Относительная продуктивность трансформантов, %
Фитаза	Y-5013	12.91 ± 0.79	0.00003	100
	Y-5229	15.27 ± 1.04		118
β -амилаза	Y-5013	6.46 ± 0.65	0.0007	100
	Y-5229	8.07 ± 1.02		125

* *Примечание:* U – единица активности (здесь и далее).

* *Note:* U, enzyme activity unit.

Таблица 3. Влияние инактивации гена *OP11* в штамме *K. phaffii* ВКПМ Y-5127 на продукцию гетерологичной фитазы
Table 3. The effect of *OP11* gene inactivation in the *K. phaffii* VKPM Y-5127 strain on the production of heterologous phytase

Штамм <i>K. phaffii</i>	Средняя продуктивность, $U \cdot ml^{-1} \cdot o.e.^{-1}$	Относительная продуктивность, %	Уровень значимости, <i>p</i>
ВКПМ Y-5127	27.11 ± 1.78	100.0	0.0119
FD1 (<i>Δopi1</i>)	34.19 ± 2.18	126.1	

ет интерес как для фундаментальной науки, так и прикладной биотехнологии. Детальное его изучение — предмет дальнейших исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа по конструированию штаммов-продуцентов ферментов выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2019-1659). Конструирование штамма-реципиента выполнено в рамках Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dersjant-Li Y., Awati A., Schulze H., Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agric.*, 2014, 95, 878–896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>
2. Das R., Kayastha A.M. β -amylase: general properties, mechanism and panorama of applications by immobilization on nano-structures. In: *Biocatalysis*. Eds Q. Husain & M. Ullah. Cham: Springer, 2019, 17–38. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25023-2_2
3. Nag M., Lahiri D., Garai S., Mukherjee D., Ray R. Regulation of β -amylase synthesis: a brief overview. *Mol. Biol. Rep.*, 2021, 48(9), 6503–6511. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06613-5>
4. Wang J.R., Li Y.Y., Liu D.N., Liu J.S., Li P., Chen L.Z., Xu S.D. Codon optimization significantly improves the expression level of α -amylase gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. *BioMed Res. Int.*, 2015, 248680. <https://doi.org/10.1155/2015/248680>
5. Karaođlan M., Erden-Karaođlan F. Effect of codon optimization and promoter choice on recombinant endopolygalacturonase production in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.*, 2020, 139, 109589. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109589>
6. Luo H., Huang H., Bai Y., Wang Y., Yang P., Meng K., Yuan T., Yao B. Improving phytase expression by increasing the gene copy number of *appA-m* in *Pichia pastoris*. *Chin. J. Biotechnol.*, 2006, 22(4), 528–533. [https://doi.org/10.1016/s1872-2075\(06\)60041-1](https://doi.org/10.1016/s1872-2075(06)60041-1)
7. Zhu T., Guo M., Tang Z., Zhang M., Zhuang Y., Chu J., Zhang S. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, 107(3), 954–963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04279.x>
8. Graf A., Gasser B., Dragosits M., Sauer M., Leparc G., Tüchler T., Kreil D., Mattanovich D. Novel insights into the unfolded protein response using *Pichia pastoris* specific DNA microarrays. *BMC Genomics*, 2008, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-390>
9. Idiris A., Tohda H., Kumagai H., Takegawa K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 86(2), 403–417. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2447-0>
10. Damasceno L.M., Huang C.J., Batt C.A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3654-z>
11. Raschmanová H., Weninger A., Knejzlik Z., Melzoch K., Kovar K. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2021, 105(11), 4397–4414. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11336-5>
12. Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(12), 5301–5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
13. Schuck S., Prinz W., Thorn K., Voss C., Walter P. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J. Cell Biol.*, 2009, 87(4), 525–536. <https://doi.org/10.1083/jcb.200907074>
14. de Ruijter J.C., Koskela E.V., Frey A.D. Enhancing antibody folding and secretion by tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Microb. Cell Fact.*, 2016, 15, 87. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0488-5>
15. Ткаченко А.А., Борщевская Л.Н., Синеокий С.П., Гордеева Т.Л. Редактирование генома *Komagataella phaffii* с использованием системы CRISPR/Cas9 для получения безмаркерного штамма-продуцента фитазы. *Биохимия*, 2023, 88(9), 1620–1630. <https://doi.org/10.31857/S0320972523090130>
16. Labun K., Montague T.G., Gagnon J.A., Thyme S.B., Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(W1), 272–276. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw398>
17. Gassler T., Heisteringer L., Mattanovich D., Prielhofer R. CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome

- editing in *Pichia pastoris*. In: *Recombinant Protein Production in Yeast. Methods in Molecular Biology*. Eds B. Gasser & D. Mattanovich. New York: Humana Press, 2019, 211–225.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9024-5_9
18. Gasser B., Prielhofer R., Marx H., Maurer M., Nocon J., Steiger M., Puxbaum V., Sauer M., Mattanovich D. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Fut. Microbiol.*, 2013, 8(2), 191–208.
<https://doi.org/10.2217/fmb.12.133>
 19. Green M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
 20. Tkachenko A.A., Kalinina A.N., Borshchevskaya L.N., Sineoky S.P., Gordeeva T.L. A novel phytase from *Citrobacter gillenii*: characterization and expression in *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*). *FEMS Microbiol. Lett.*, 2021, 368(2), fnaa217.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa217>
 21. Chen C.C., Wu P.H., Huang C.T., Cheng K.J. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, 35(4), 315–320.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.007>
 22. Jain A., Jain R., Jain S. Quantitative analysis of reducing sugars by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA method). In: *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*. New York, Humana: Springer Protocols Handbooks, 2020, 181–183.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43
 23. Sugita A., Okada M., Tani A., Minoda M., Yamaguchi S. [Review: Symposium on Amylases and Related Enzymes] Thermostable β -amylase from *Bacillus flexus*. *Bull. Appl. Glycosci.*, 2011, 1(2), 194–200.
https://doi.org/10.5458/bag.1.2_194

Effect of *OPI1* Gene Inactivation on the Production of Heterologous Phytase and β -Amylase in *Komagataella phaffii*

A. A. Tkachenko^{a, #}, L. N. Borshchevskaya^a, S. P. Sineoky^a, and T. L. Gordeeva^a

^aNational Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

[#]e-mail: artur.tka4enko10@gmail.com

Abstract—A new recipient strain, *Komagataella phaffii* VKPM Y-5229 ($\Delta his4\Delta opi1$), has been developed. Its use allows constructing strains with increased production of recombinant proteins. The *OPI1* gene encoding the Opi1 transcription regulator, a functional analogue of the negative regulator of lipid biosynthesis Opi1p from *Saccharomyces cerevisiae*, was identified. The *OPI1* gene was knocked out in the *K. phaffii* VKPM Y-5013 ($\Delta his4$) strain using a highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing system. The effect of *OPI1* gene inactivation on the production of recombinant heterologous enzymes, *Citrobacter gillenii* phytase and *Priestia flexa* β -amylase, was studied. The average productivity of transformants based on the VKPM Y-5229 ($\Delta his4\Delta opi1$) strain secreting phytase or β -amylase increased by 18 and 25%, respectively, compared to the productivity of transformants derived from the parent strain. Furthermore, it was demonstrated that inactivation of the *OPI1* gene in a multicopy phytase-producing strain led to an increase in productivity by more than 26%. The results obtained can be employed for developing industrial strains producing heterologous proteins based on *K. phaffii*, as well as for increasing the production of targeted proteins in existing producing strains.

Keywords: *Komagataella phaffii*, CRISPR/Cas9, Opi1, heterologous proteins, productivity