

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491958 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.20

(22) Дата подачи заявки
2023.01.26

(51) Int. Cl. C12P 23/00 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КАРОТЕНОИДОВ ИЗ КИСЛОЙ СЫВОРОТКИ

(31) 63/304,412

(32) 2022.01.28

(33) US

(86) PCT/US2023/061361

(87) WO 2023/147410 2023.08.03

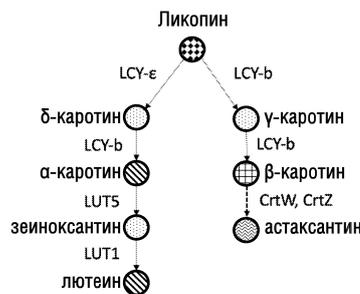
(88) 2023.09.28

(71) Заявитель:
МАССАЧУСЕТС ИНСТИТЮТ
ОФ ТЕКНОЛОДЖИ (US);
ЭГРИКАЛЧУРАЛ ДЖЕНОМИКС
ИНСТИТЮТ ЭТ ШЭНЬЧЖЭНЬ,
ЧАЙНИЗ АКАДЕМИ ОФ
ЭГРИКАЛЧУРАЛ САЙЕНСИЗ (CN)

(72) Изобретатель:
Стефанопулос Грегори, Фэй
Эдриан, Ма Юншо, Катсимпурас
Константинос (US), Мано Дзунити
(JP)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к подвергнутым метаболической инженерии клеткам, способным к продукции каротеноидов из кислой сыворотки.



202491958

A1

A1

202491958

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581697EA/061

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КАРОТЕНОИДОВ ИЗ КИСЛОЙ СЫВОРОТКИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке по 35 U.S.C. § 119(e) испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США No. 63/304412, поданной 28 января 2022 г., озаглавленной «METHODS OF PRODUCING CAROTENOIDS FROM ACID WHEY», полное содержание которой, таким образом, приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ЭЛЕКТРОННОЙ ФОРМЕ

Полное содержание электронного списка последовательностей (M065670522WO00-SEQ-KVC.xml; размер: 83140 байт; и дата создания: 19 января 2023 г.) приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам и композициям, относящимся к получению каротеноидов из кислой сыворотки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Кислая сыворотка (AW) представляет собой жидкий побочный продукт отходов, утилизация которого без обработки выдвигает серьезную проблему для окружающей среды, из-за высокого содержания в ней органических веществ. В США ее в основном получают при изготовлении набирающего популярность греческого йогурта, но существуют также другие крупные источники во всем мире, такие как изготовление панира. По оценкам, более чем более чем 3 миллиона тонн AW получают в США каждый год. Это накладывает экономическую нагрузку на молочную промышленность, но в то же самое время представляет большую возможность, поскольку ее можно использовать для получения ценных продуктов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится, по меньшей мере частично, к способам и композициям для получения каротеноидов из кислой сыворотки. Аспекты настоящего изобретения относятся к модифицированным клеткам дрожжей, способным к продукции каротеноидов из кислой сыворотки. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к модифицированным клеткам дрожжей, способным превращать кислую сыворотку в пируват, посредством метаболизма молочной кислоты, метаболизма глюкозы или метаболизма галактозы через путь Лелуара. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к модифицированным клеткам дрожжей, способным превращать пируват в ликопин через путь мевалоната. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к модифицированным клеткам дрожжей, способным превращать ликопин в астаксантин и/или лютеин. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки дрожжей, описанные в настоящем описании, являются модифицированными для преодоления ингибирования

субстратом. Аспекты настоящего изобретения относятся к генетически модифицированной клетке дрожжей (модифицированной клетке), содержащей гетерологичный ген, где гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-галактозидазы (LacA); один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов, способных превращать молочную кислоту в пируват; один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути Лелуара; и один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути мевалоната. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка представляет собой жиροобразующую клетку дрожжей. В некоторых вариантах осуществления, жиροобразующая клетка представляет собой клетку *Yarrowia lipolytica*.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов, способных превращать молочную кислоту в пируват, выбран/выбраны из группы, состоящей из транспортера лактата (JEN1) и лактатдегидрогеназы (LDH). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути Лелуара, выбран/выбраны из группы, состоящей из GAL10M, GAL1, GAL7 и GAL10E. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути мевалоната, выбран/выбраны из группы, состоящей из GGPPS, CarRP и CarB. В некоторых вариантах осуществления, GGPPS представляет собой GGPPSxd, происходящий из *Xanthophyllomyces dendrorhous*, GGPPSsa, происходящий из *Sulfolobus acidocaldarius*, GGPPStc, происходящий из *Taxus canadensis*, GGPPSpa, происходящий из *Pantoea agglomerans*, GGPPSyl, происходящий из *Yarrowia lipolytica*.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы. В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-4. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий tHMGR, ERG12, IDI и ERG20 из пути мевалоната (MVA), и/или холинкиназу (СК) и изопентенилфосфаткиназу (IPK). В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит: гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-каротинкетоллазы (CrtW); и гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-каротингидроксилазы (CrtZ). В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность CrtW, является слитым с ферментом, имеющим активность CrtZ. В некоторых вариантах осуществления, слитый фермент CrtW/CrtZ содержит сигнал локализации. В некоторых вариантах осуществления, сигнал локализации нацеливает

слитый фермент CrtW/CrtZ на эндоплазматический ретикулум, пероксисому и/или липидные тельца.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, и/или гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность эпсилон-ликопинциклазы. В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность каротеноидгидроксилазы 1 (LUT1) и/или гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность каротеноидгидроксилазы 5 (LUT5).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дрожжей, описанная в настоящем описании, является способной преодолевать ингибирование субстратом. Термин «ингибирование субстратом», в рамках изобретения, относится к наиболее распространенному отклонению от кинетики Михаэлиса-Ментен, возникающему у приблизительно 25% из известных ферментов. Ингибирование субстратом возникает, когда концентрация ферментного субстрата превышает оптимальный параметр и уменьшает скорость роста клетки.

Другой аспект настоящего изобретения относится к генетически модифицированной клетке дрожжей (модифицированной клетке), содержащей: первый гетерологичный ген, где первый гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-каротинкетотазы (CrtW); и второй гетерологичный ген, где второй гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-каротингидроксилазы (CrtZ); где модифицированная клетка продуцирует бета-каротин. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка представляет собой жиροобразующую клетку дрожжей. В некоторых вариантах осуществления, жиροобразующая клетка представляет собой клетку *Yarrowia lipolytica*. В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность CrtW, является слитым с ферментом, имеющим активность CrtZ. В некоторых вариантах осуществления, слитый фермент CrtW/CrtZ содержит сигнал локализации. В некоторых вариантах осуществления, сигнал локализации нацеливает слитый фермент CrtW/CrtZ на эндоплазматический ретикулум, пероксисому и/или липидные тельца.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу превращения источника углерода в ликопин и/или бета-каротин, включающему: приведение в контакт модифицированной клетки, описанной в настоящем описании, с источником углерода; и инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в ликопин и/или бета-каротин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода представляет собой кислую сыворотку. В

некоторых вариантах осуществления, источник углерода превращают в ликопин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода превращают в бета-каротин.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу превращения источника углерода в астаксантин, включающему: приведение в контакт модифицированной клетки, описанной в настоящем описании, с источником углерода; и инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в астаксантин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу превращения источника углерода в альфа-каротин, включающему: приведение в контакт модифицированной клетки, описанной в настоящем описании, с источником углерода; и инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в альфа-каротин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу превращения источника углерода в лютеин, включающему: приведение в контакт модифицированной клетки, описанной в настоящем описании, с источником углерода; и инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в лютеин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к ферменту, имеющему активность бета-ликопинциклазы, содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2. Другой аспект настоящего изобретения относится к ферменту, имеющему активность бета-ликопинциклазы, содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3. Другой аспект настоящего изобретения относится к ферменту, имеющему активность бета-ликопинциклазы, содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4.

Каждое из ограничений изобретения может охватывать различные варианты осуществления настоящего изобретения. Таким образом, предусматривают, что каждое из ограничений изобретения, включающее любой один элемент или комбинации элементов, может быть включено в каждый аспект изобретения. Настоящее изобретение не является ограниченным в его применении к деталям конструирования и аранжировки компонентов, указанным в следующем описании или проиллюстрированным на чертежах. Для настоящего изобретения возможны другие варианты осуществления и практика или осуществление различными способами. Также, фразеология или терминология, используемая в настоящем описании, предназначена для цели описания, и ее не следует рассматривать как ограничивающую. Использование «включающий», «содержащий», или «имеющий», «вмещающий», «вовлекающий», и их вариантов в настоящем описании понимают как охватывающее объекты, перечисленные после них, и их эквиваленты, так же как, дополнительные объекты. Как используют в настоящем описании и прилагаемой

формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного.

Детали одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения приведены в описании ниже. Другие признаки или преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующих чертежей и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующие чертежи формируют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации конкретных аспектов настоящего изобретения, которые можно лучше понять со ссылкой на один или несколько из этих чертежей в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в настоящем описании. Сопутствующие чертежи не предназначены для изображения в масштабе. Чертежи являются только иллюстративными и не являются необходимыми для внедрения настоящего изобретения. Для целей ясности, не каждый компонент может быть отмечен на каждом чертеже. На чертежах:

ФИГ. 1А-1С. **ФИГ. 1А,** Потребление сахаров и органических кислот, присутствующих в AW, сконструированным штаммом *Y. lipolytica* (Lac, Лактоза; Glu, Глюкоза; Gal, Галактоза). **ФИГ. 1В,** Продукция клеточной биомассы и липидов в ходе ферментации. **ФИГ. 1С,** состав жирных кислот клеток дрожжей.

ФИГ. 2. Метаболические пути для синтеза каротеноидов из ликопина.

ФИГ. 3. Обзор попыток метаболической инженерии, требуемых для биосинтеза ликопина из AW с использованием *Y. lipolytica*. Гидролиз лактозы включал введение β -галактозидазы (*LacA*), улучшение превращения лактата в пируват включало сверхэкспрессию транспортера лактата (*JEN1*) и дегидрогеназы (*LDH*), ускорения нативного метаболизма галактозы достигали посредством сверхэкспрессии генов пути Лелуара, и биосинтез ликопина включал введение трех гетерологичных генов: геранилгеранилдифосфатсинтазы (*GGPPsd*), фитоенсинтазы (*CarRP*) и фитоендесатуразы (*CarB*).

ФИГ. 4. Сконструированный субклеточный путь биосинтеза астаксантина в *Yarrowia lipolytica*. Цитозольный ацетил-СоА являлся общим предшественником для образования липидов и синтеза астаксантина. β -каротин, синтезированный в эндоплазматическом ретикулуме (ER), секвестрировался в липидное тельце (LB), агрегированное из триацилглицерида (TAG). Сохраняемый TAG гидролизовался до свободной жирной кислоты (FFA), транспортировался в пероксисому, в сопровождении транслокации β -каротина, и превращался в ацетил-СоА посредством β -окисления. Гены, вовлеченные в предшествующий сконструированный путь биосинтеза β -каротина в *Y. lipolytica*, представляют собой *GGPPsa*, *CarRP* и *CarB*. *CrtW/Z* (*CrtW* и *CrtZ*) представляют собой гетерологичные субклеточные сконструированные ферменты, ассоциированные с биосинтезом астаксантина в этом исследовании. *GGPPsa*, геранилгеранилдифосфатсинтаза из *Sulfolobus acidocaldarius*; *CarRP*, бифункциональная фитоенсинтаза/ β -ликопинциклаза

из *Mucor circinelloides*; CarB, фитоендегидрогеназа из *M. circinelloides*. CrtW, β -каротинкетоксилаза; CrtZ, β -каротингидроксилаза. IPP, изопентенилдифосфат; DMAPP, диметилаллилдифосфат; FPP, фарнезилдифосфат; GGPP, геранилгеранилдифосфат; FBP, фруктозо-1,6-бисфосфатаза; DHAP, дигидроксиацетонфосфат; G3P, глицеральдегид-3-фосфат; PA, фосфатидная кислота; DAG, диацилглицерин. Точечными стрелками показаны множественные каталитические стадии.

ФИГ. 5А-5В. Оптимизация продукция астаксантина. **ФИГ. 5А**, путь биосинтеза астаксантина, начинающийся с β -каротина, конструировали посредством введения β -каротинкетоксилазы (CrtW) и гидроксилазы (CrtZ). Экспрессия пути сопровождалась изменением цвета колоний с желтого на красный. **ФИГ. 5В**, максимизация продукции астаксантина посредством тестирования CrtW и CrtZ из разнообразных организмов. Для оптимальной комбинации PsCrtW из видов *Paracoccus* и HpCrtZ из *Haematococcus pluvialis* получали наиболее высокую продукцию астаксантина после 72 часов культивирования в встряхиваемой колбе. Различные комбинации конструкций указаны ниже каждого столбца (черный круг, включали; пустой, не включали). Показаны среднее и стандартное отклонение (s.d.) для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 6А-6С. Биосинтез астаксантина посредством различных слитых конструкций в *Y. lipolytica*. **ФИГ. 6А**, пути биосинтеза астаксантина. В зависимости от порядка кетонизации и гидроксилирования, обеспечиваемых посредством CrtW и CrtZ, соответственно, являлись возможными множество путей от β -каротина до астаксантина, которые приводили к образованию различных промежуточных соединений (указанных номерами). CrtW, β -каротинкетоксилаза; CrtZ, β -каротингидроксилаза. **ФИГ. 6В**, графики HPLC каротеноидов после культивирования в колбе продуцирующего астаксантин штамма, экспрессирующего слитый CrtW-Z или индивидуальные ферменты CrtW+Z. По сравнению со штаммом YL02, несущим индивидуальные ферменты CrtW+Z, накопление кантаксантина (④) и зеаксантина (⑥) в штамме со слитым CrtW-Z являлось значительно уменьшенным, в то время как промежуточное соединение 3'-гидроксиэхиненон (⑤) накапливалось до более высоких уровней. **ФИГ. 6С**, накопление астаксантина в штаммах, несущих функциональные слитые ферменты. По сравнению с контрольным штаммом, экспрессирующим индивидуальные ферменты CrtW+Z, уровни астаксантина в штаммах, экспрессирующих слитые ферменты, являлись значимо повышенными. Для штамма со слитым CrtW-Z показана дополнительно улучшенная продуктивность, по сравнению с продуктом слияния типа CrtZ-W. Линкерная последовательность, GGGGSGGPGS (SEQ ID NO: 5). Показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 7А-7Д. Инженерия субклеточных органелл дополнительно способствовала биосинтезу астаксантина. **ФИГ. 7А**, схема биосинтеза астаксантина при нацеливании зависимо от слитого фермента CrtW-Z пути на эндоплазматический ретикулум (ER), липидное тельце (LB) и пероксисому посредством слияния с последовательностями KDEL, олеозина и SKL, соответственно. **ФИГ. 7В**, хроматографические профили каротеноидов для штаммов с нацеливанием на органеллы. По сравнению со штаммом с цитозольной экспрессией, накопление промежуточных соединений, особенно 3'-гидроксиэхиненона (⑤), эхиненона (②) и β-каротина (①), являлось значительно уменьшенным в штаммах с двойной (ER и LB) или тройной (ER, LB и пероксисомы) инженерией органелл. **ФИГ. 7С-7Д**, сборка пути астаксантина в субклеточных органеллах дополнительно ускоряла превращение β-каротина в астаксантин. Кроме того, одновременное нацеливание слитого фермента CrtW-Z на все три органеллы, LB, ER и пероксисому, приводило к наиболее высокому титру астаксантина после 72 часов культивирования в встряхиваемой колбе в среде YPD. Различные комбинации конструкций указаны ниже каждого столбца (+, с нацеливанием на органеллы; -, без нацеливания на органеллы). Показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов. Статистические различия анализировали с использованием t-критерия Стьюдента, и $P < 0,05$ считали статистически значимым. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$.

ФИГ. 8А-8С. Для штаммов, сконструированных для продукции астаксантина, достигали высоких титров в периодических культурах с подпиткой. **ФИГ. 8А**, продукция астаксантина штаммом YL17, культивируемым в среде YPD, содержащей различную исходную концентрацию глюкозы (20, 30, 40 и 50 г/л). **ФИГ. 8В-8С**, профили периодической ферментации с подпиткой продуцирующего астаксантин штамма YL17 в конических колбах (**ФИГ. 8В**) и 3-л биореакторе (**ФИГ. 8С**). Показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 9. Анализ HPLC каротеноидов в штаммах со слитым ферментом, несущих CrtZ-W или CrtW-Z. ①, β-каротин; ②, эхиненон; ④, кантаксантин; ⑤, 3'-гидроксиэхиненон; ⑥, зеаксантин; ⑨, астаксантин.

ФИГ. 10А-10В. **ФИГ. 10А**, эффект дополнительной копии слитого фермента CrtW-Z на продукцию астаксантина в сконструированных штаммах. Каждый символ плюс (+) показывает одну копию гена, интегрированного в геном. Показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов. **ФИГ. 10В**, анализ HPLC каротеноидов в сконструированном штамме YL12, несущем дополнительную копию слитого фермента CrtW-Z. ①, β-

каротин; ②, эхиненон; ④, кантаксантин; ⑤, 3'-гидроксиэхиненон; ⑥, зеаксантин; ⑨, астаксантин.

ФИГ. 11. Микроскопическое изображение клеток, продуцирующих β -каротин. Количество β -каротина явно накапливалось в липидных тельцах клетки.

ФИГ. 12А-12С. Прогнозирование трансмембранных спиралей в ферментах биосинтеза β -каротина GGPPsa (**ФИГ. 12А**), CarRP (**ФИГ. 12В**) и CarB (**ФИГ. 12С**) с использованием сервера ТМНММ v. 2.0.

ФИГ. 13. Субклеточная локализация ферментов биосинтеза β -каротина GGPPsa, CarRP и CarB по слиянию с белком GFP, соответственно.

ФИГ. 14. Хроматографические профили каротеноидов для сконструированного штамма YL17, культивированного в различных средах. Уникальным различием между средами являлась исходная концентрация глюкозы. YPD20, 20 г/л глюкозы; YPD30, 30 г/л глюкозы; YPD40, 40 г/л глюкозы; YPD50, 50 г/л глюкозы. ①, β -каротин; ②, эхиненон; ④, кантаксантин; ⑤, 3'-гидроксиэхиненон; ⑥, зеаксантин; ⑨, астаксантин.

ФИГ. 15. Корреляция между сухой массой клеток (DCW) и OD₆₀₀ для продуцирующих астаксантин клеток. DCW рассчитывали на основании измеренной OD₆₀₀ и использования коэффициента пересчета.

ФИГ. 16А-16Д. Для ликопинциклазы показан эффект ингибирования субстратом. **ФИГ. 16А**, ликопин ингибировал нижестоящий по отношению к нему фермент, ликопинциклазу, посредством ингибирования субстратом. Следовательно, более высокая скорость образования ликопина, чем скорость его последующего превращения в β -каротин, может усугублять дисбаланс, приводящий к наработке ликопина. **ФИГ. 16В**, после 3 суток ферментации в средах YPD, уровни β -каротина в штаммах, экспрессирующих соответствующие биосинтетические гены из различных источников, показали, что для пары CarB/CarRP достигали более высоких уровней продуктивности. **ФИГ. 16С**, гетерологичная сверхэкспрессия синтазы GGPP из *X. dendrorhous* (GGPPxd) увеличивала продукцию β -каротина, но также приводила к преобладающему накоплению ликопина, его биосинтетического предшественника. ND, не детектировано. **ФИГ. 16Д**, измерения относительной каталитической активности ликопинциклазы показали, что активность CarRP (или CarR) дикого типа являлась двухфазной в отношении концентрации ликопина, что указывает на ингибирование субстратом. В отличие от этого, вариант Y27R CarRP (или CarR) являлся полностью свободным от ингибирования субстратом. CarR, укороченный CarRP без домена Р. Для **ФИГ. 16В-16Д**, показаны среднее и стандартное отклонение (s.d.) для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 17А-17Е. Прекращение ингибирования субстратом посредством белковой инженерии. **ФИГ. 17А**, с использованием прогнозированной модели белка, несколько положений в домене R (ликопинциклазы) CarRP были идентифицированы как подходящие

локализации для мутации, чтобы уменьшить ингибирование субстратом. Одиночные замены показаны посредством светлых сфер, в то время как двойные замены показаны посредством темных сфер. **ФИГ. 17В**, избирательность для β -каротина тестировали всего для 50 полученных вариантов. По сравнению с диким типом (WT), для Y27R, V175W и T31R-F92W (заклученных в рамки) показана значимо увеличенная избирательность для β -каротина, позволяющая предполагать уменьшение ингибирования субстратом. Данные представляют собой среднее значение для двух независимых экспериментов. **ФИГ. 17С-17D**, по сравнению с контрольным штаммом YLMA03, несущим CarRP дикого типа, для вариантов показаны значимо увеличенная продукция β -каротина, совместно с уменьшением накопления ликопина (**ФИГ. 17С**). В частности, для штамма YLMA11, экспрессирующего CarRP (Y27R), достигнут титр 2,38 г/л (**ФИГ. 17С**), в дополнение к высокой избирательности 98% (**ФИГ. 17D**). **ФИГ. 17Е**, прекращение ингибирования субстратом позволяло распределять более высокие потоки по каналам в направлении пути синтеза каротеноидов (посредством сверхэкспрессии MVA и IUP), улучшая титры β -каротина, с сохранением в то же время высокой избирательности. В конечном счете, 4,22 г/л β -каротина продуцировали в YLMA15 с ~98% избирательностью. Для культур с использованием штаммов, содержащих IUP, 30 мМ изопренол (**ФИГ. 31**) добавляли к средам после истощения глюкозы. Для **ФИГ. 17С** и **17Е**, показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 18А-18G. Опосредованный GGPPS ограничитель метаболического потока эффективно ослаблял ингибирование субстратом. **ФИГ. 18А**, опосредованный GGPPS ограничитель метаболического потока изменял количество потока через путь синтеза каротеноидов, таким образом, регулируя скорости образования ликопина. **ФИГ. 18В**, изменений активности GGPPS можно было достигать посредством экспрессии ферментов из различных организмов в *Y. lipolytica*, как показано по изменению скорости синтеза GGPP *in vivo*. В этих экспериментах, использовали фоновый штамм rolf без модификаций, отличных от экспрессии GGPPS. **ФИГ. 18С**, по сравнению со штаммом, экспрессирующим GGPPxd, другие штаммы, содержащие GGPPS с более низкой активностью, ослабляли эффект ингибирования субстратом ликопинациклазы. Более медленные скорости образования ликопина предотвращали его накопление и таким образом, почти весь ликопин превращался в β -каротин. ND, не детектировано. **ФИГ. 18D**, зависимости от времени ферментации показали, что сбалансированный путь с ослабленным GGPPsa (YLMA25) приводил к минимальной наработке ликопина на протяжении эксперимента, в соответствии с YLMA11, который содержал вариант Y27R CarRP. В отличие от этого, быстрое накопление ликопина наблюдали в штаммах с избыточно эффективным GGPPxd (YLMA03). **ФИГ. 18Е**, экспрессирующие кассеты генов, составляющих сбалансированный путь (GGPPsa, CarB и CarRP), последовательно вводили в штамм rolf-T для продукции β -каротина. С использованием более высоких количеств копий, титры β -каротина увеличивали вплоть до 2,13 г/л, и избирательность β -каротина максимизировали. **ФИГ. 18F**, сверхэкспрессия MVA и IUP дополнительно улучшали

синтез β -каротина, с сохранением в то же время его высокой избирательности. **ФИГ. 18G**, с использованием избыточно эффективного GGPPxd для преднамеренного запуска ингибирования субстратом, совместно с мутантным CarRP(E78K), конструировали продуцирующий ликопин штамм, для которого достигали титра 2,62 г/л. ND, не детектировано. Для **ФИГ. 18B-18G**, показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 19A-19D. Установление баланса распределения ацетил-CoA между синтезом липидов и изопреноидов обеспечивало преимущества для накопления каротеноидов. **ФИГ. 19A**, цитозольный ацетил-CoA разделялся между двумя конкурирующими путями, биосинтезом липидов заново и путем MVA. Однако, липидные тельца внутри клетки формировали гидрофобную область, в которой каротеноиды могли быть секвестрированы, таким образом способствуя их накоплению. Следовательно, оба пути являлись необходимыми, и оптимальное разделение потока являлось критическим для достижения высоких титров и содержания на клетку каротеноидов. Кроме того, внутриклеточные TAG могли быть использованы в качестве источника углерода для образования ацетил-CoA, что, в свою очередь, предоставляло структурные блоки для каротеноидов. **ФИГ. 19B**, содержание липидов зависело от соотношения C/N сред, и более высокое соотношение C/N способствовало продукции липидов. **ФИГ. 19C-19D**, титр (**ФИГ. 19C**) и содержание (**ФИГ. 19D**) β -каротина также являлись функциями соотношения C/N сред. Однако, в отличие от содержания липидов, которое увеличивалось монотонно с соотношением C/N, существовал оптимум для продукции β -каротина. Наиболее высокие титр и содержание на клетку β -каротина возникали при соотношении C/N 9:1 в средах Y₁₀P₁₀D₅₀. Для **ФИГ. 19B-19D**, показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 20A-20C. Клеточные липиды управляли биосинтезом каротеноидов посредством β -окисления в ходе стационарной фазы после истощения глюкозы. **ФИГ. 20A**, мониторинг концентрации глюкозы, содержания липидов и содержания β -каротина на протяжении ферментации выявило, что содержание β -каротина продолжало увеличиваться после того, как глюкоза была истощена из сред. Параллельно, содержание внутриклеточных липидов быстро уменьшалось после истощения глюкозы, что позволяет предполагать, что клетки мобилизовали TAG в качестве альтернативного источника углерода, когда глюкоза больше не являлась доступной. **ФИГ. 20B-20C**, отслеживание углерода из клеток, культивируемых в [U-¹³C]глюкозе, и природное содержание стеариновой кислоты показали, что β -окисление может являться источником для ацетил-CoA предназначенного для синтеза каротеноидов. Показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 21A-21F. Ферментация в биореакторе β -каротина и ликопина для сконструированных штаммов. **ФИГ. 21A** и **21D**, профили ферментации продуцирующего β -каротин штамма YLMA15 (**ФИГ. 21A**) и продуцирующего ликопин штамма YLMA34 (**ФИГ. 21D**) в 3-л биореакторе. **ФИГ. 21B** и **21E**, для культур с β -каротином показан глубокий красно-оранжевый цвет после 240 часов культивирования (**ФИГ. 21B**), в то

время как для культур с ликопином показан глубокий красный цвет (ФИГ. 21Е). ФИГ. 21С и 21F, микроскопические изображения клеток, продуцирующих β -каротин (ФИГ. 21С) и ликопин (ФИГ. 21F). Показано, что β -каротин и ликопин накапливались внутри клеток и распространялись по цитоплазме в большинстве клеток. Для ФИГ. 21А и ФИГ. 21D, показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 22. Схема метаболического пути, приводящего к продукции β -каротина в *Y. lipolytica*. Сконструированный путь биосинтеза β -каротина включал гены из пути мевалоната, которые подвергались прямой повышающей регуляции (черный, путь утилизации изопентенола (IUP, белый, и синтез β -каротина, (точечный. HMG-CoA, гидроксиметилглутарил-CoA; MVA, мевалонат; MVAP, мевалонат-5-фосфат; IP, изопентенилмонофосфат; IPP, изопентенилдифосфат; DMAPP, диметилаллилдифосфат; GPP, геранилпирофосфат; FPP, фарнезилпирофосфат; GGPP, геранилгеранилпирофосфат. tHMGGR, укороченная HMG-CoA-редуктаза; ERG12, мевалонаткиназа; IDI, изопентенилдифосфатизомераза; ERG20, геранил/фарнезилдифосфатсинтаза; GGPPS, синтаза GGPP. CrtYB или CarRP, бифункциональная фитоенсинтаза/ β -ликопинциклаза; CrtI или CarB, фитоендегидрогеназа. СК, холинкиназа; IPK, изопентенилфосфаткиназа.

ФИГ. 23. Нарушение *TRP1* в штамме *Y. lipolytica* polf посредством Crispr-Cas9. Одиночная делеция аденина (одиночное подчеркивание в положении -110 вызывала мутацию сдвига рамки считывания (двойное подчеркивание с прекращенной активностью TRP1.

ФИГ. 24А-24D. Эффекты стадии конструирования β -ликопинциклазы на продукцию β -каротина. **ФИГ. 24А**, CarRP представлял собой бифункциональный фермент с доменом R и доменом P, придающими активность ликопинциклазы и фитоенсинтазы, соответственно. Два способа использовали для выделения активности циклазы: укорочения гена *CarRP* после домена R и мутации потери функции внутри домена P (D409G). **ФИГ. 24В**, увеличение количества копий бета-ликопинциклазы не улучшало синтез β -каротина. **ФИГ. 24С**, относительный уровень экспрессии гена, относительно увеличенного количества копий CarRP. **ФИГ. 24D**, экспрессия β -ликопинциклаз из различных других организмов приводила к улучшениям титров β -каротина. Однако, приращения являлись незначительными, и накопление ликопина все еще наблюдали. Показаны среднее и стандартное отклонение (s.d.) для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 25. Уровни промежуточных соединений, вовлеченных в путь синтеза β -каротина. Измеряли внутриклеточные концентрации биосинтетических промежуточных соединений от FPP до β -каротина, и ликопин являлся единственным агрегирующим предшественником. Показанные данные представляли собой среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 26. Прогнозирование структуры бета-ликопинциклазы в CarRP. Схема белка CarRP, показывающая, что 6 трансмембранных спиралей находились внутри домена R (β -циклазы).

ФИГ. 27. Вычислительная модель домена R (ликопинциклазы) CarRP. Показатель доверия модели по TrRosetta составлял 0,79, что позволяло предполагать высокую достоверность структурной модели.

ФИГ. 28. Кластеризация вариантов для иллюстрации расстояния между последовательностями. Варианты кластеризовали с использованием PhyML, чтобы убедиться в распределении тестируемых вариантов.

ФИГ. 29. Относительный уровень экспрессии гена, относящийся к вариантам CarRP. Относительные уровни экспрессии гена CarRP в сконструированных штаммах, несущих мутантный CarRP, так же как CarRP дикого типа (WT), количественно оценивали посредством RT-ПЦР. ACT1 использовали в качестве гена внутреннего контроля для нормализации. Показанные данные представляли собой среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 30. Пространственное картирование замен, удаляющих ингибирование субстратом. Положения для успешных вариантов картировали на вычислительной модели ликопинциклазы, где Y27R, V175W и T31R-F92W показаны в сферах. Все замены, по-видимому, являлись локализованными в одной и той же пространственной области фермента.

ФИГ. 31. Эффект изопренола или пренола на рост клеток. Изомерами изопентенола изопренолом или пренолом подпитывали штамм rolf в средах YPD в изменяющихся концентрациях. OD₆₀₀ измеряли после 24 часов культивирования. На основании этих результатов, обнаружили, что 30 мМ изопренол или 10 мМ пренол представляют собой подходящую концентрацию для всех последующих экспериментов. Показанные данные представляли собой среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 32А-32В. Нарушение активности ликопинациклазы в CarRP. **ФИГ. 32А**, мутация E78K в домене R CarRP, как показано посредством точечного прямоугольника, приводила к потере функции активности циклазы. **ФИГ. 32В**, хроматограммы HPLC показали, что мутантный CarRP^{E78K} полностью прекращал образование β-каротина.

ФИГ. 33. Конструирование пути MVA и IUP дополнительно способствовали биосинтезу ликопина. Сверхэкспрессия нативных генов в пути MVA улучшала синтез ликопина. Кроме того, дополнительное введение IUP в продуцирующие ликопин штаммы дополнительно улучшало титры. Показанные данные представляет собой среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 34. Составы модифицированных сред YPD и YNB, используемых в этом исследовании.

ФИГ. 35. Определение оптимальной исходной концентрации глюкозы для продукции β-каротина. Клетки культивировали в средах Y₅P₁₀D_n, где n представлял собой исходную концентрацию глюкозы. После 3 суток ферментации, измеряли количество потребленной глюкозы, OD₆₀₀ и титры β-каротина. Обнаружили, что оптимальная исходная концентрация глюкозы составляет 50 г/л. Свыше этого, продуктивность штамма подвергалась неблагоприятному влиянию, и скорости потребления глюкозы также

уменьшались, предположительно, из-за осмотического стресса. Показаны среднее и s.d. для трех независимых экспериментов. Статистические различия анализировали с использованием t-критерия Стьюдента, и $P < 0,05$ считали статистически значимым. * $P < 0,05$.

ФИГ. 36. Сравнение роста клеток в средах с изменяющимися соотношениями C/N. В этих экспериментах, использовали штамм YLMA15, и обнаружили, что биомасса уменьшалась с увеличением соотношения C/N. Показанные данные представляли собой среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 37. С использованием оптимизированных сред Y₁₀P₁₀D₅₀, титры ликопина дополнительно улучшали. Показанные данные представляли собой среднее и s.d. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 38. Микроморфология клеток YLMA15 на протяжении ферментации. Клетки, собранные в различных временных точках на протяжении культивирования, визуализировали под микроскопом, и наблюдения согласовывались с профилем ферментации. В присутствии глюкозы в средах на протяжении начальных 3 суток, липидные капли в клетках постепенно агломерировали в липидные тельца, которые секвестрировали продуцированный β-каротин. Однако, из-за разрушения TAG, липидные тельца больше не были видимыми во время более поздних стадий истощения глюкозы, что, в свою очередь, вынуждало накопленный β-каротин становиться более диспергированным по клетке.

ФИГ. 39. Хроматограмма HPLC каротеноидов, полученных из YLMA15 после периодической ферментации с подпиткой. Избирательность для β-каротина рассчитывали на основании относительного содержания ликопина и β-каротина.

ФИГ. 40А-40В. Корреляция между сухой массой клеток (DCW) и OD₆₀₀ для продуцирующих β-каротин клеток (**ФИГ. 40А**) и продуцирующих ликопин клеток (**ФИГ. 40В**). DCW рассчитывали на основании измеренной OD₆₀₀ и использования коэффициента пересчета.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к способу превращения промышленных отходов (например, отходов молочной промышленности) в ценные пищевые и кормовые ингредиенты (например, каротеноиды) и/или микробиологический корм для животных с использованием сконструированных клеток дрожжей. Эти ингредиенты могут представлять собой природные продукты, которые принадлежат к семейству изопреноидов (также известных как терпеноиды) и в основном синтезируются растениями. Конкретно, в настоящем описании описан синтез каротеноидных соединений, таких как ликопин, бета-каротин и астаксантин, из отходов молочной промышленности, и способы метаболической и белковой инженерии для улучшения их синтеза. Другие продукты из семейства изопреноидов можно сходным образом синтезировать из отходов кислой сыворотки (AW).

В настоящее время, двумя наиболее распространенными применениями AW являются либо применение в качестве удобрения, добавляемого непосредственно в почву, либо применение смешанной с силосом для корма скота. Однако, в обоих случаях, количество AW, которое можно использовать, является ограниченным, и это малоценные применения. И наоборот, обработка AW в сооружениях для обработки сточных вод увеличивает стоимость получения многих пищевых продуктов. В целом, не существует хорошего решения, в то время как большой объем потенциально поддающихся ферментации питательных веществ, таких как лактоза, галактоза и молочная кислота, остается неиспользованным (Menchik, et al. 2019). Кроме того, этот желтоватый побочный продукт AW является непривлекательным для пищевой промышленности поскольку его кислый и соленый вкус, высокие уровни золы, и низкие уровни белка ограничивают его применения в продуктах питания (Lievore, et al. 2015).

Компании молочной промышленности предпринимали попытки разработать альтернативные способы для манипуляций с AW. Например, в Chobani (Norwich, NY) и Commonwealth Dairy (Brattleboro, VT) используют систему фильтрации с использованием обратного осмоса для выделения воды из AW и уменьшения стоимости транспортировки. В других, таких как General Mills (Minneapolis, MN), используют анаэробное разложение для превращения AW в метан, который можно впоследствии использовать для покрытия некоторых энергетических потребностей предприятия, посредством питаемых метаном электрических генераторов. Однако, все они представляют собой способы с низкой добавленной стоимостью, и доходы, получаемые посредством превращения AW в метан, являлись относительно низкими. В General Mills также разработаны способы либо для нейтрализации AW для ее использования в пищевых продуктах в качестве объемобразующего средства или обогатителя пищевых продуктов (Публикация Патента США 2014/0348981), либо для получения олигосахаридов, которые могут служить в качестве растворимых волокон в зерновых продуктах или хлебобулочных изделиях (Публикация Патента США 2014/0348979). В Danone описан способ получения AW со стабильным содержанием лактозы для обеспечения более согласованного способа выделения лактозы (Международный патент No. WO 2016/177701 A1). В Arla Food Ingredients (Viby, Denmark) и Ultima Foods (Quebec, Canada) используют белковые растворы и ультрафильтрацию, соответственно, в попытке минимизировать образование AW в ходе получения пищевых продуктов.

Помимо производящих молочные продукты компаний, множество групп исследователей предпринимали попытки найти способы использования AW. Например, был предложен способ получения сиропа глюкозы/галактозы и белка молочной сыворотки из AW с использованием комбинации ультрафильтрации и катализируемого кислотой термического гидролиза лактозы (Lindsay et al., 2018). Однако, этот способ требует дорогостоящих мембран для ультрафильтрации для выделения белка молочной сыворотки, и высоких температур для гидролиза лактозы. Кроме того, нежелательные катализируемые кислотой реакции деградации ограничивают выходы продукта, в то время

как ценность конечного продукта является низкой. Карбоновые кислоты со средней длиной цепи (МССА), такие как н-капроновая кислота, являлись другой группой соединений, на которые нацеливались как на продукт ферментации АW с использованием микробиомов (Xu et al., 2018). Использование одного биореактора приводило к низкой специфичности, применительно к продукции МССА; таким образом, необходимо использовать более разветвленную систему, разделяющую на фазы микробиомы в различных технологических условиях. Эта система, использующая биореакторы в сериях, увеличивает стоимость процесса и страдает проблемами масштабируемости. Недавно, АW использовали в качестве альтернативы среды для роста для микроводорослей с целью получения фермента β -галактозидазы (Bentahar et al., 2019). В другой работе, исследователи предпринимали попытки конвертировать лактозу, присутствующую в АW, в галактоолигосахариды (GOS), с использованием двух коммерчески доступных β -галактозидаз из *Aspergillus oryzae* и *Kluyveromyces lactis*, достигая низких выходов GOS.

Кроме того, в нескольких сообщениях упомянуто использование АW в кисломолочных напитках для получения преимуществ питательных веществ, обнаруженных в АW и замены воды (Lievore et al., 2015; Skryplonek,] et al, 2019). Однако, соленый и кислый вкус АW нарушает необходимые качества полученного посредством ферментации напитка в отношении вкуса, запаха и послевкусия. Кроме того, опубликовано, что использование АW в кисломолочных продуктах изменяет вязкость и таким образом, текстуру продукта, приводя к более низкой предпочтительности в ходе органолептической оценки (Lievore et al., 2015). Маскировка вкуса и запаха АW может требовать добавления дополнительных ингредиентов, несмотря на увеличенную стоимость.

Природные продукты являются богатым источником биоактивных молекул, разнообразные свойства которых поддерживают многочисленные применения в фармацевтической, пищевой промышленности и промышленности ароматизирующих и душистых веществ (Atanasov et al., 2015; Cragg, 1998; Dhingra et al., 1999; Dzubak et al., 2006; Zhou et al., 2009). Из-за их структурной сложности и очень низкого содержания в природных источниках, химический синтез этих соединений и экстракция из растений представляли определенные проблемы (Chemler and Koffas, 2008; Martin et al., 2003), побуждающие прилагать усилия для их получения посредством сконструированных микроорганизмов. Большинство усилий в метаболической инженерии для получения химических продуктов, главным образом сфокусированы на манипуляции с функциональной реконструкцией метаболических путей в цитозоле. Однако, этот способ часто приводит к плохим выходам или образованию нежелательных побочных продуктов, из-за разветвленного клеточного метаболизма, вовлекающего обширное перекрестное взаимодействие и сложно организованные регуляторные механизмы (Ajikumar et al., 2010; Martin et al., 2003). В этом отношении, природная внутриклеточная компартментализация эукариотических клеток может предоставлять идеи для типа метаболической инженерии, который может успешно справляться с этими задачами (Hammer and Avalos, 2017).

Настоящее изобретение также относится к конструированию сконструированных клеток дрожжей посредством применения способов метаболической и белковой инженерии, позволяющих получение внутриклеточных каротеноидных соединений в высоких концентрациях с использованием либо глюкозы, либо AW в качестве исходного сырья. Каротеноидные соединения, после стадии очистки, можно использовать в качестве антиоксидантов (обогащение пищевых продуктов), пищевых красителей, пищевых добавок, кормовых добавок, и в косметических продуктах или продуктах для личной гигиены. Другим продуктом может являться микробиологический корм для животных, обогащенный каротеноидами.

Основными преимуществами этого способа являются: **(1)** не требуется предшествующая обработка AW, и биопроцесс можно проводить в нестерильных условиях, **(2)** полная утилизация AW, образующая поток воды, свободный от органических соединений, **(3)** синтез специализированных ингредиентов с высокой добавленной стоимостью и совместное получение микробиологического корма для животных, благоприятные для экономики процесса, **(4)** возможность использования как разведенной, так и концентрированной AW, **(5)** простой и масштабируемый способ ферментации, **(6)** соответствующий GRAS микроорганизм-хозяин, позволяющий безопасное внедрение технологии в существующие маслобойные предприятия, что также означает непосредственный доступ к исходному сырью, **(7)** зона размещения оборудования, совместимая с областью, занятой резервуарами для хранения AW, и **(8)** значительное увеличение доходов для получения пищевых продуктов и сокращение расходов, относящихся к переработке отходов и транспортировке AW к фермам, приводящее к увеличению доходов на вплоть до 38%, например, по сравнению с современным изготовлением греческого йогурта.

Настоящее изобретение также относится к способам компартментализации метаболических путей в субклеточных органеллах дрожжей. Субклеточные органеллы привлекают растущее внимание из-за их уникального физикохимического окружения, и содержания ферментов, метаболитов и кофакторов, которые могут обеспечивать благоприятные условия для функционирования различных метаболических путей (Ayer et al., 2013; Hammer and Avalos, 2017). Сборка путей внутри меньших субклеточных компартментов не только увеличивает локальные концентрации субстратов и ферментов, что приводит к более быстрым скоростям реакций, но также предотвращает отклонение промежуточных соединений к конкурирующим путям (Avalos et al., 2013). До настоящего времени, большинство исследований компартментализации метаболических путей у дрожжей проводили с использованием модельного организма *Saccharomyces cerevisiae*, включая использование митохондрий для видов топлива, химических веществ и лекарственных средств (Avalos et al., 2013; Farhi et al., 2011; Szczebara et al., 2003; Yuan and Ching, 2016), компартментализацию путей в пероксисомах (Sheng et al., 2016; Zhou et al., 2016), нацеливание на ER и аппарат Гольджи для получения топлива и лекарственных средств (Thodey et al., 2014) и вакуолярную компартментализацию (Bayer et al., 2009).

Нацеливание биосинтетических путей на эти субклеточные компартменты обеспечивало преимущество для получения желательных продуктов в этом организме. С другой стороны, несмотря на эти преимущества инженерии органелл, ее полный потенциал в жиорообразующих дрожжах *Yarrowia lipolytica* остается в большой степени неисследованным. Существует возможность получения выгоды в перспективе компартментализации путей в этих дрожжах, благодаря их уникальной способности накапливать большие количества внутриклеточных липидов в форме липидных капель.

Астаксантин, высокоценный пигмент - производное каротеноида, являлся объектом растущего интереса из-за его широких применений в пищевой, кормовой, нутрицевтической, косметической и фармацевтической промышленности (Ambati et al., 2014). Эти применения обусловлены его сильной антиоксидантной (Hama et al., 2012), противовоспалительной (Bennedsen et al., 2000) и противораковой активностью (Chew et al., 1999). Традиционные способы получения астаксантина включают химический синтез и экстракцию из природных источников. Однако, опасения по поводу биологической безопасности для химических способов, и высокой стоимости и изменчивости продуктов, полученных посредством способа его экстракции, ограничивают его широкое применение (Qi et al., 2020). Альтернативно, метаболический путь, сконструированный для биосинтеза астаксантина, был успешно показан в различных организмах-хозяевах, как правило, возникая в клеточной цитоплазме (Diao et al., 2020; Gong et al., 2020; Henke et al., 2018; Jiang et al., 2020; Jin et al., 2018; Kildegaard et al., 2017; Lemuth et al., 2011; Li et al., 2020; Lu et al., 2017; Ma et al., 2016; Nogueira et al., 2019; Park et al., 2018; Qi et al., 2020; Scaife et al., 2009; Scaife et al., 2012; Tramontin et al., 2019; Ukibe et al., 2009; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2018; Zhou et al., 2019; Zhou et al., 2017; Zhou et al., 2015). Выходы астаксантина в этих сконструированных микроорганизмах являются довольно низкими для экономически эффективной коммерциализации, в основном, из-за плохой эффективности превращения предшественника β -каротина в астаксантин.

В способах метаболической инженерии для продукции высокоценных химических веществ в микроорганизмах, по большей части, используют цитозоль в качестве главного реакционного сосуда. Однако, секвестрация ферментов и субстратов, и метаболическое перекрестное взаимодействие часто предотвращают эффективный синтез целевых соединений в цитозоле. Компартментализация органелл в эукариотических клетках позволяет предполагать пути для преодоления этих проблем. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к экспрессии пути биосинтеза астаксантина в суборганеллах жиорообразующих дрожжей *Yarrowia lipolytica*. В некоторых вариантах осуществления, ферменты пути астаксантина можно сливать вместе для улучшения активности в отношении субстрата и эффективности реакции. В некоторых вариантах осуществления, слияние двух ферментов, превращающих β -каротин в астаксантин, кетолазы и гидроксилазы β -каротина, функционирует лучше, чем экспрессия индивидуальных ферментов. В некоторых вариантах осуществления, индивидуальные или слитые ферменты пути биосинтеза астаксантина экспрессируются в компартментах

липидного тельца, эндоплазматического ретикулума или пероксисомы. В некоторых вариантах осуществления, нацеливание пути астаксантина на субклеточные органеллы не только ускоряет превращение β -каротина в астаксантин, но также значительно уменьшает накопление кетокаротеноидных промежуточных соединений.

Настоящее изобретение относится, по меньшей мере частично, к способам и композициям для получения каротеноидов из кислой сыворотки. Аспекты настоящего изобретения относятся к модифицированным клеткам дрожжей (например, жиरोобразующим клеткам дрожжей), способным к продукции каротеноидов из кислой сыворотки. Термин «жирообразующая клетка дрожжей», в рамках изобретения, относится к клеткам дрожжей, богатых мембранной структурой и субклеточными компартментами, которые обеспечивают гидрофобное окружение, идеальное для метаболической инженерии и получения промышленных продуктов. В некоторых вариантах осуществления, жирообразующие клетки дрожжей представляют собой жирообразующие клетки дрожжей, использующие ацетат для роста клеток и синтеза продукта. Например, в некоторых вариантах осуществления, жирообразующие клетки дрожжей представляют собой клетки *Yarrowia lipolytica*. *Y. lipolytica* представляет собой непатогенные жирообразующие дрожжи, которые могут использовать разнообразное множество источников углерода, включая органические кислоты, углеводороды, и различные жиры и масла. Термин «жирообразующая» относится к микроорганизму, который может накапливать более чем 20% от сухой массы его клетки в форме липида (см. C. Ratledge et al., Microbial routes to lipids. Biochem Soc Trans. 1989 December; 17(6):1139-41). Иллюстративные жирообразующие клетки включают дрожжи, такие как *Yarrowia lipolytica*, *Candida 107*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus*, *Trichosporon pullulan*, *Lipomyces lipofer*, *Schwanniomyces occidentalis* и другие виды из числа *Yarrowia*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium* и *Cryptococcus*; жирообразующие бактерии, такие как бактерии *Rhodococcus*, *Acinetobacter* и *Streptomyces*; и жирообразующие водоросли и микроводоросли.

Аспекты настоящего изобретения относятся к генетически модифицированной клетке дрожжей (модифицированной клетке), содержащей: гетерологичный ген, где гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-галактозидазы (LacA); один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов, способных превращать молочную кислоту в пируват; один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути Лелуара; и один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути мевалоната. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка представляет собой жирообразующую клетку дрожжей. В некоторых вариантах осуществления, жирообразующая клетка представляет собой клетку *Yarrowia lipolytica*. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий ген, доставляют в клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка содержит полинуклеотид, содержащий ген. В некоторых вариантах осуществления, фермент, кодируемый геном, доставляют в клетку.

В некоторых вариантах осуществления, клетка содержит фермент, кодируемый геном. В некоторых вариантах осуществления, ген представляет собой гетерологичный ген. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид представляет собой гетерологичный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, фермент представляет собой гетерологичный фермент. Термин «гетерологичный», как может быть использовано в настоящем описании, использован взаимозаменяемо с термином «рекомбинантный» и термином «экзогенный». Гетерологичный ген, полинуклеотид или фермент относится к гену, полинуклеотиду или ферменту, который был введен в клетку-хозяина или экспрессирован в ней. Гетерологичный ген представляет собой ген, который был введен в клетку-хозяина или экспрессирован в ней. Гетерологичный полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, который был введен в клетку-хозяина или экспрессирован в ней. Гетерологичный фермент представляет собой фермент, который был введен в клетку-хозяина или экспрессирован в ней. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный ген, полинуклеотид, или фермент происходит из организма или вида, отличного от клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный ген, полинуклеотид, или фермент представляет собой синтетический ген, полинуклеотид или фермент. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный ген, полинуклеотид, или фермент представляет собой дополнительную копию гена, полинуклеотида или фермента, эндогенно экспрессируемого клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный ген может быть модифицирован посредством мутации. Термин «мутация», как может быть использовано в настоящем описании, относится к замене, изменению или модификации нуклеотида в нуклеиновой кислоте, по сравнению с ее последовательностью дикого типа. Например, без ограничения, мутации могут включать замены, вставки, делеции или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, присутствует по меньшей мере одна мутация. В некоторых вариантах осуществления, присутствуют более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления, когда присутствуют более одной мутации, мутации являются отличными (например, не из одного и того же типа (например, замены, вставки, делеции)). В некоторых вариантах осуществления, когда присутствуют более одной мутации, мутации являются одинаковыми (например, не из одного и того же типа (например, замены, вставки, делеции)). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, мутации приводят к сдвигу рамки считывания.

Мутации, которые, как описано в настоящем описании выше, представляют собой области (например, секции, части, нуклеиновые основания, нуклеозиды, нуклеотиды) данной нуклеиновой кислоты (например, ДНК, РНК), которые отличаются, по сравнению с их нуклеиновой кислотой дикого типа, наиболее часто отражаются в каждой цепи нуклеиновой кислоты. Это означает, что, когда мутация присутствует в образце, ее и комплементарную ей последовательность наблюдают в каждой цепи нуклеиновой кислоты при секвенировании. Однако, это представляет проблему, с учетом того, что образец может содержать одноцепочечные части (например, пропуски, выступающие

концы), или области, которые могут инициировать ресинтез цепи (например, одноцепочечные разрывы). Это представляет проблему, поскольку, если поврежденное основание присутствует в такой одноцепочечной области, или другой области, подвергаемой ресинтезу, поврежденное основание может давать инструкции синтезу своей комплементарной цепи включать основание, которое исходно не присутствовало в нуклеиновой кислоте, из которой был получен образец (поскольку поврежденные основания могут вызывать неканонические спаривания оснований). То же самое может происходить, если одна цепь содержит несоответствующие основания. В таких случаях, для несовпадения может быть показано спаренное соответствие в ресинтезированной комплементарной последовательности, вместо ее нативного несоответствующего основания. Когда это происходит, секвенирование обеих цепей прочитывает мутацию в каждой из цепей, таким образом, показывает мутацию, однако, эта мутация может не является истинным отражением исходной нуклеиновой кислоты. Такие мутации названы «ложные мутации» в настоящем описании. Ложные мутации представляют собой мутации, возникающие в результате ресинтеза комплементарных цепей нуклеиновой кислоты, которые не представляют собой исходную (например, нативную, относящуюся к дикому типу) комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, из которой был получен образец.

Термины «дикого типа» и «нативный», как может быть использовано взаимозаменяемо в настоящем описании, представляют собой термины в данной области, понимаемые специалистом в данной области, и означают типичную форму объекта, организма, штамма, гена или характеристики, как она встречается в природе, как отличают от сконструированных, мутантных или являющихся вариантами форм.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов, способных превращать молочную кислоту в пируват, выбран/выбраны из группы, состоящей из транспортера лактата (JEN1) и лактатдегидрогеназы (LDH). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути Лелуара, выбран/выбраны из группы, состоящей из GAL10M, GAL1, GAL7 и GAL10E.

Путь Лелуара представляет собой метаболический путь, известный в данной области. Путь Лелуара используют клетки для катаболизма D-галактозы. Термин «катаболизм», в рамках изобретения, относится к метаболическому процессу разложения комплексных молекул (например, D-галактозы) в живых организмах с образованием более простых молекул (например, глюкоза-1-фосфата). Как известно специалисту в данной области, путь Лелуара превращает галактозу в глюкоза-1-фосфат, среди прочего, посредством ферментативной активности GAL10M, GAL1, GAL7 и GALE. В некоторых вариантах осуществления, путь Лелуара используют в модифицированных клетках для продукции пирувата.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути мевалоната, выбран/выбраны из

группы, состоящей из геранилгеранилдифосфатсинтазы (GGPPS), фитоенсинтазы (CarRP) и фитоендесатуразы (CarB). В некоторых вариантах осуществления, GGPPS представляет собой GGPPSxd, происходящий из *Xanthophyllomyces dendrorhous*, GGPPSsa, происходящий из *Sulfolobus acidocaldarius*, GGPPStc, происходящий из *Taxus canadensis*, GGPPSra, происходящий из *Pantoea agglomerans*, GGPPSyl, происходящий из *Yarrowia lipolytica*.

Путь мевалоната (MVA) представляет собой другой метаболический путь, известный в данной области. Путь MVA, также известный как путь изопреноидов или путь HMG-CoA-редуктазы, представляет собой важный метаболический путь, образующий, среди прочего, изопентенилпирофосфат (IPP) и диметилаллилпирофосфат (DMAP) из ацетил-CoA. В некоторых вариантах осуществления, IPP и DMAP в пути MVA подвергаются дальнейшему метаболизму до фарнезилдифосфата (FPP). В некоторых вариантах осуществления, FPP в пути MVA подвергается дальнейшему метаболизму до геранилгеранилпирофосфата (GGPP) посредством GGPP (например, GGPPSxd, GGPPSsa, GGPPStc, GGPPSra, GGPPSyl). В некоторых вариантах осуществления, GGPP в пути MVA подвергается дальнейшему метаболизму до фитоена посредством CarRP. В некоторых вариантах осуществления, фитоен в пути MVA подвергается дальнейшему метаболизму до ликопина посредством CarB.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы. Аминокислотная последовательность фермента бета-ликопинциклазы представлена в настоящем описании как SEQ ID NO: 1:

MLLTYMEVHLYYTLPLVGVLSWLSRPYYTATDALKFKFLTLVAFTTASAWDNY
IVYHNKAWSYCPTCVTAVIGYVPLEEYMFHIMTLTVAFTNLVMRWHLHSFFIRPETPVM
QSVLVRLVPITALLITAYKAWHLAVPGKPLFYGSCILWYACPVLALLWFGAGEYMMRR
PLAVLVSIAPLTLFLCWVDVVAIGAGTWDISLATSTGKFVPHLPVEEFMFFALINTVLV
FGTCAI (SEQ ID NO: 1)

В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 1. Термины «процент идентичности», «идентичность последовательности», «% идентичности», «% идентичности последовательности» и «на % идентичный», как они могут быть взаимозаменяемо использованы в настоящем описании, относятся к количественному показателю сходства между двумя последовательностями (например, нуклеиновой кислоты или аминокислот). Процент идентичности последовательности геномной ДНК, последовательности интронов и экзонов, и аминокислотной последовательности между человеком и другими видами меняется с типом вида, где шимпанзе имеет наивысший процент идентичности с человеком из всех видов в каждой категории.

Расчет процента идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот, например, можно осуществлять посредством выравнивания двух последовательностей для целей оптимального сравнения (например, можно вносить пропуски в одну или обе из первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания, и неидентичные последовательности можно не учитывать для целей сравнения). В конкретных вариантах осуществления, длина последовательности, выравненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% от длины эталонной последовательности. Затем сравнивают нуклеотиды в соответствующих положениях нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято таким же нуклеотидом, как и в соответствующем положении во второй последовательности, тогда молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности последовательности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, разделяемых последовательностями, принимая во внимание количество пропусков и длину каждого пропуска, которые необходимо вводить для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с использованием математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определять с использованием таких способов, как описанные в *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, New York, 1987; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Майерса и Миллера (CABIOS, 1989, 4:11-17), встроенного в программу ALIGN (версии 2.0) с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за длину пропуска 12 и штрафа за пропуск 4. Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно, альтернативно, определять с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG с использованием матрицы NWSgapdna.CMP. Способы, общепотребительные для определения процента идентичности между последовательностями, включают, но без ограничения, способы, описанные в Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J Applied Math.*, 48:1073 (1988); содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Способы определения идентичности закодированы в публично доступных компьютерных программах. Иллюстративное компьютерное программное обеспечение для определения гомологии

между двумя последовательностями включает, но без ограничения, пакет программного обеспечения GCG, Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990)).

Когда указан процент идентичности, или его диапазон (например, по меньшей мере, более чем и т.д.), если не указано иное, конечные точки должны являться включительными, и диапазон (например, по меньшей мере 70% идентичность) должен включать все диапазоны внутри указанного диапазона (например, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95,5%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 96,5%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97,5%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 98,5%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,6%, по меньшей мере 99,7%, по меньшей мере 99,8%, по меньшей мере 99,9% идентичность) и все их приращения (например, десятые процента (например, 0,1%), сотые процента (например, 0,01%) и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления, фермент бета-ликопинциклазу (SEQ ID NO: 1) подвергают модификации или мутагенезу для увеличения или уменьшения ферментативной активности. В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-4. В некоторых вариантах осуществления, содержит следующие аминокислотные замены, относительно SEQ ID NO: 1: Y27R; V175W; T31R; F92W; или T31R и F92W.

Аминокислотная последовательность одной такой бета-ликопинциклазы с модифицированной активностью представлена в настоящем описании как SEQ ID NO: 2:

MLLTYMEVHLYYTLPLVGLVLSWLSRPRYTATDALKFKFLTLVAFTTASAWDNYI
VYNKAWSYCPTCVTAVIGYVPLEEYMFIIIMTLLTVAFTNLVMRWHLHSFFIRPETPVM
QSVLVRLVPITALLITAYKAHWLAVPGKPLFYGSCILWYACPV LALLWFGAGEYMMRR
PLAVLVSIALPTLFLCWVDVVAIGAGTWDISLATSTGKFVPHLPVEEFMFFALINTVLV
FGTCAI (SEQ ID NO: 2)

Аминокислотная последовательность другой такой бета-ликопинциклазы с модифицированной активностью представлена в настоящем описании как SEQ ID NO: 3:

MLLTYMEVHLYYTLPLVGLVLSWLSRPYYTATDALKFKFLTLVAFTTASAWDNY
IVYNKAWSYCPTCVTAVIGYVPLEEYMFIIIMTLLTVAFTNLVMRWHLHSFFIRPETPVM
QSVLVRLVPITALLITAYKAHWLAVPGKPLFYGSCILWYACPV LALLWFGAGEYMMRR
PLAWLVSIALPTLFLCWVDVVAIGAGTWDISLATSTGKFVPHLPVEEFMFFALINTVLV
FGTCAI (SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность еще одной такой бета-ликопинциклазы с модифицированной активностью представлена в настоящем описании как SEQ ID NO: 4:

MLLTYMEVHLYYTLPLVGLVLSWLSRPYYTARDALKFKFLTLVAFTTASAWDNY
IVYHNKAWSYCPTCVTAVIGYVPLEEYMFPIIMTLLTVAWTNLVMRWHLHSFFIRPETPV
MQSVLVRLVPITALLITAYKAWHLAVPGKPLFYGSCILWYACPVLALLWFGAGEYMMR
RPLAVLVSIALPTLFLCWVDVVAIGAGTWDISLATSTGKFVVPHPVVEEFMFFALINTVL
VFGTCAI (SEQ ID NO: 4)

В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий tHMGR, ERG12, IDI и ERG20 из пути мевалоната (MVA), и/или холинкиназу (СК) и изопентенилфосфаткиназу (IPK). В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит: гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-каротинкетотазы (CrtW); и гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-каротингидроксилазы (CrtZ). В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность CrtW, является слитым с ферментом, имеющим активность CrtZ. В некоторых вариантах осуществления, слитый фермент CrtW/CrtZ содержит сигнал локализации. В некоторых вариантах осуществления, сигнал локализации нацеливает слитый фермент CrtW/CrtZ на эндоплазматический ретикулум, пероксисому и/или липидные тельца. Термин «слитый фермент», в рамках изобретения, относится к ферментному белку, который содержит два или более отдельных белков. В некоторых вариантах осуществления, слитый фермент получают посредством соединения двух или более генов, исходно кодирующих отдельные белки. В некоторых вариантах осуществления, два или более генов, соединенных вместе, транслируются в один белок или фермент. Термин «сигнал локализации» относится к пептидному фрагменту, экспрессируемому в представляющем интерес белке, который опосредует транспорт указанного белка в целевую локализацию внутри или вне клетки. В некоторых вариантах осуществления, сигнал локализации представляет собой короткий пептидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, сигнал локализации нацеливает белок на эндоплазматический ретикулум. В некоторых вариантах осуществления, сигнал локализации нацеливает белок на пероксисому. В некоторых вариантах осуществления, сигнал локализации нацеливает белок на липидные тельца клетки.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, и/или гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность эpsilon-ликопинциклазы. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность каротеноидгидроксилазы 1 (LUT1), и/или гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность каротеноидгидроксилазы 5 (LUT5).

Другой аспект настоящего изобретения относится к генетически модифицированной клетке дрожжей (модифицированной клетке), содержащей: первый

гетерологичный ген, где первый гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-каротинкетотазы (CrtW); и второй гетерологичный ген, где второй гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-каротингидроксилазы (CrtZ); где модифицированная клетка продуцирует бета-каротин. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная клетка представляет собой жиροобразующую клетку дрожжей. В некоторых вариантах осуществления, жиροобразующая клетка представляет собой клетку *Yarrowia lipolytica*. В некоторых вариантах осуществления, фермент, имеющий активность CrtW, является слитым с ферментом, имеющим активность CrtZ. В некоторых вариантах осуществления, слитый фермент CrtW/CrtZ содержит сигнал локализации. В некоторых вариантах осуществления, сигнал локализации нацеливает слитый фермент CrtW/CrtZ на эндоплазматический ретикулум, пероксисому и/или липидные тельца.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу превращения источника углерода в ликопин и/или бета-каротин, включающему: приведение в контакт модифицированной клетки, описанной в настоящем описании, с источником углерода; и инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в ликопин и/или бета-каротин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода представляет собой кислую сыворотку. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода превращают в ликопин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода превращают в бета-каротин. Термин «источник углерода», в рамках изобретения, относится к любым природным или искусственным источникам углерода, таким как диоксид углерода, метан или кислая сыворотка.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу превращения источника углерода в астаксантин, включающему: приведение в контакт модифицированной клетки, описанной в настоящем описании, с источником углерода; и инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в астаксантин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу превращения источника углерода в альфа-каротин, включающему: приведение в контакт модифицированной клетки, описанной в настоящем описании, с источником углерода; и инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в альфа-каротин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу превращения источника углерода в лютеин, включающему: приведение в контакт модифицированной клетки, описанной в настоящем описании, с источником углерода; и инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для

превращения источника углерода в лютеин. В некоторых вариантах осуществления, источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к ферменту, имеющему активность бета-ликопинциклазы, содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2. Другой аспект настоящего изобретения относится к ферменту, имеющему активность бета-ликопинциклазы, содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3. Другой аспект настоящего изобретения относится к ферменту, имеющему активность бета-ликопинциклазы, содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4.

Детали одного или нескольких вариантов осуществления способов и продуктов, описанных в настоящем описании, указаны в описании ниже. Другие признаки или преимущества способов и продуктов, описанных в настоящем описании, станут очевидными из следующих чертежей и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

Термины «приблизительно» или «около», как может быть использовано взаимозаменяемо в настоящем описании, и как применимо к одному или нескольким представляющим интерес значениям, относится к значению, которое является сходным с указанным эталонным значением. В конкретных вариантах осуществления, термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, лежащему в пределах 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любом направлении (т.е., процентов более чем, или процентов менее чем) от указанного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (например, когда такое число превышает 100% от возможного значения).

Фразеология и терминология, используемые в настоящем описании, предназначены для цели описания, и их не следует рассматривать как ограничивающие. Использование таких терминов, как «включающий», «содержащий», «имеющий», «вмещающий», «вовлекающий» и/или их вариантов в настоящем описании понимают как охватывающее объекты, перечисленные после них, и их эквиваленты, так же как дополнительные объекты.

Способы и продукты, описанные в настоящем описании, далее проиллюстрированы в следующих примерах, которые никаким образом не следует рассматривать как дополнительно ограничивающие. Полное содержание всех ссылок (включая литературные источники, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно находящееся на рассмотрении патентные заявки), процитированных на протяжении настоящего описания, таким образом, явно приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

ПРИМЕРЫ

Чтобы способы и продукты, описанные в настоящем описании, можно было более полно понять, приведены следующие примеры. Примеры, описанные в настоящем описании, представлены для иллюстрации систем и способов, представленных в

настоящем описании, и их никаким образом не следует рассматривать как ограничивающие их объем.

Пример 1. Микробная инженерия для получения каротеноидов из кислой сыворотки

Этот пример относится к конструированию жиροобразующих дрожжей *Yarrowia lipolytica* для сверхпродукции каротеноидов из кислой сыворотки и/или для корма для животных с различными составами жиров и белков, в соответствии с необходимостью. Ранее было показано, что экспрессия секретируемой внеклеточной β -галактозидазы, вместе с экспрессией генов для ускорения нативного пути метаболизма галактозы, придает *Y. lipolytica* способность потреблять все сахара в AW (Mano et al., 2020). В настоящем описании описаны оптимальная комбинация генов для синтеза ликопина и два независимых способа, которые почти полностью обходят ингибирование субстратом в ходе синтеза бета-каротина. Ингибирование субстратом являлось нежелательным в промышленных применениях микроорганизмов, используемых для синтеза продукта. Хотя исследовано несколько способов для устранения этого ограничения, таких как иммобилизация фермента, системы двухфазных разделенных биореакторов, способ периодической подпитки субстратом и белковая инженерия, большинство этих решений были ограничены системами, где ингибирование было задано исходным субстратом, и являлись сложными для применения в контексте микробной инженерии для химического производства. Следует отметить, что эти способы были первоначально продемонстрированы для продуцирующих каротеноиды штаммов *Y. lipolytica* с использованием глюкозы в качестве источника углерода. Затем, эти результаты послужили информацией для конструирования клеток дрожжей для эффективной продукции каротеноидных соединений из AW.

Биосинтез бета-каротина и ликопина из глюкозы

Сначала направляемый структурой дизайн белка, в сочетании с филогенетической информацией, использовали для получения вариантов белка с уменьшенным ингибированием. Например, идентифицирована одиночная мутация гена ликопинциклазы, которая полностью прекращала ингибирование субстратом без уменьшения активности фермента, что привело к заметному увеличению продукции β -каротина. Синтез β -каротина в *Y. lipolytica* требует гетерологичной экспрессии трех генов, кодирующих ферменты фитоенсинтазу, фитоендегидрогеназу и ликопинциклазу. Геранилгеранилдифосфатсинтазу (GGPPS) также рассматривали, поскольку она контролировала поток, направленный к синтезу каротеноида вместо синтеза стерола. Источниками соответствующих генов служили эукариотические организмы, и их вводили в *Y. Lipolytica* штамма rolf с использованием нарушения *TRP1*.

Второй способ приводил к получению в результате сходных титров и избирательности для β -каротина посредством уменьшения потока углерода через каротеноидный путь и таким образом, предотвращал накопление ингибирующего метаболита до ингибирующих уровней, в отличие от традиционных парадигм инженерии

пути. Этого достигали посредством разработки опосредованного геранилгеранилпирофосфатсинтазой (GGPPS) метаболического клапана, регулирующего скорость образования субстрата ликопина, который эффективно ослаблял ингибирование субстратом. В то время как этот способ уменьшал поток через представляющий интерес путь, прирост благодаря супрессии уровней субстрата и таким образом, поддержанию высокой ферментативной активности, с избытком компенсировал любые потери продуктивности, страдающей от отклонения потока.

Следует также отметить, что профиль продукта β -каротина против ликопина можно сдвигать посредством изменения активности GGPPS *in vivo*. С высокой активностью GGPP можно получать преимущество преобразования в специализированный продуцирующий ликопин штамм. При комбинировании этой идеи со специфическим вариантом ликопинциклазы, успешно получали высокие концентрации ликопина с не поддающимися детекции количествами β -каротина. Дополнительного увеличения продукции ликопина достигали посредством сверхэкспрессии пути MVA и введения IUP с использованием глюкозы в качестве субстрата.

Предшествующие исследования установили, что липофильный характер каротеноидов способствует их хранению в липидных тельцах клеток. В Larroude et al. обнаружено, что сконструированный штамм - сверхпродуцент липидов являлся способным к продукции большего количества β -каротина с титром 6,5 г/л, в то же время сопровождающейся продукцией 42,6 г/л липидов (Larroude et al., 2018). Предоставляя в то же время совместимые компартменты для накопления гидрофобных изопреноидов, образование TAG заново также потребляет большое количество источника углерода, что приводит к ограниченному потоку ацетил-CoA в MVA, образующий продукт путь. В этом исследовании было показано, что нативная способность *Y. lipolytica* к накоплению TAG являлась достаточной для секвестрации каротеноида. С помощью установления баланса распределения потока между синтезом каротеноидов и липидов посредством коррекций соотношения C/N, более крупную часть пула ацетил-CoA для продукции каротеноида сохраняли, достигая высоких титров и содержания на клетку.

Кроме того, было показано, что биосинтез каротеноидов во время стационарной фазы с истощением глюкозы поддерживался посредством деградации клеточных липидов. В ходе экспериментов ферментации с использованием глюкозы в качестве субстрата, обнаружено, что содержание β -каротина продолжало расти в ходе стационарной фазы, даже после того, как глюкоза в средах была истощена. На протяжении процесса ферментации, содержание липидов первоначально увеличивалось, достигая максимума на сутки 3, после чего оно быстро уменьшалось, когда глюкоза была полностью израсходована. В то же время, несмотря на уменьшение содержания липидов, содержание β -каротина продолжало расти далеко за точкой истощения глюкозы, что позволяет предполагать, что TAG были использованы для поддержания метаболической активности и синтеза каротеноидов. Когда глюкоза все еще присутствовала во время начальных 3 суток, липидные капли внутри клеток постепенно агломерировали в липидные тельца,

которые секвестрировали продуцированный β -каротин. Однако, являлось также очевидным, что липидные тельца больше не были видимыми во время более поздних стадий ферментации из-за разрушения TAG, которое, в свою очередь, вынуждало накопленный β -каротин становиться более диспергированным по клетке. Показано, что ацетил-СоА, образованный посредством β -окисления, может поддерживать путь MVA и в конечном счете вносить вклад в образование β -каротина. Таким образом, это, вероятно, является механизмом, используемым клетками для превращения TAG в каротеноиды во время стационарной фазы с истощением глюкозы.

Биосинтез бета-каротина и ликопина из AW

После получения результатов для синтеза каротеноидов с использованием глюкозы в качестве субстрата, был сконструирован штамм *Y. lipolytica*, который может полностью потреблять все органические молекулы, обнаруженные в AW, и продуцировать высокие концентрации ликопина. Работа по конструированию включала введение генов, ответственных за деградацию лактозы, ассимиляцию галактозы, высокую активность GGPP, фитоендегидрогеназы и бифункциональной фитоенсинтазы/ликопинциклазы эукариотического происхождения, несущей одиночную мутацию, которая прекращает активность циклазы. Устанавливали баланс распределения потока между синтезом ликопина и липидов посредством коррекций соотношения C/N, при котором достигали максимума концентрации ликопина приблизительно 3 г/л с 0,230 мг ликопина на грамм сухой массы клеток с использованием необработанной AW в качестве субстрата. Сконструированный штамм также являлся способным потреблять концентрированную AW. Через 14 суток все сахара и органические кислоты в AW были полностью израсходованы, что приводило в результате к максимальной концентрации ликопина 13,4 г/л.

Биосинтез астаксантина

Другим высокоценным пигментом - производным каротеноида является астаксантин. Астаксантин являлся объектом растущего интереса из-за его широких применений в пищевой, кормовой, нутрицевтической, косметической и фармацевтической промышленности. Эти применения обусловлены его сильной антиоксидантной, противовоспалительной и противораковой активностью.

Нижестоящий биосинтетический путь астаксантина из β -каротина был сконструирован посредством экспрессии гена *CrtW*, кодирующего β -каротинкетотазу, и гена *CrtZ*, кодирующего β -каротингидроксилазу. Для дальнейшего улучшения гетерологичного пути, получали кетотазы и гидроксилазы β -каротина из разнообразных организмов в качестве источников. Принимая во внимание, что главными природными источниками для синтеза астаксантина являются бактерии и водоросли, проводили специфический скрининг дополнительных *CrtW* и *CrtZ* из таких организмов, и идентифицировали пару *CrtW/Z*, максимизирующую микробную продукцию астаксантина с использованием сверхпродуцирующего β -каротин штамма. Кроме того, определили, что увеличение физической близости между *CrtW* и *CrtZ* могло минимизировать расстояние

субстрат-фермент и увеличивло скорости реакций. Для осуществления этого, получили активные продукты слияния между ферментами CrtW и CrtZ, с целью улучшения контакта продуктов/предшественников с соответствующими ферментами посредством создания более близкого микроокружения. Слитые ферменты являлись более эффективными при продукции астаксантина, по сравнению с индивидуальными ферментами. Наконец, экспрессию слитых ферментов исследовали при нацеливании на различные субклеточные компартменты. Первоначально, слитый фермент CrtW-Z нацеливали на липидные тельца (LB) посредством его связывания с последовательностью олеозина, таким образом, предоставляя альтернативный биологический путь для биосинтеза астаксантина. Для нацеленного на LB штамма получали значительно более высокий титр астаксантина, по сравнению с контрольным штаммом, экспрессирующим этот путь в цитозоле. Нацеливание слитого фермента на другие органеллы, такие как эндоплазматический ретикулум и пероксисомы, далее улучшало титры астаксантина из глюкозы, где одновременное нацеливание на все три суборганеллы приводило даже к лучшим результатам.

Другие продукты

Результаты, описанные в настоящем описании, продемонстрировали технологию конструирования жиरोобразующих дрожжей *Y. lipolytica* для биосинтеза разнообразного множества продуктов с высокой добавленной стоимостью. Технологию можно также применять для получения других продуктов из AW, подобных лютеину, альфа-каротину и другим членам изопреноидного пути. Таким образом, настоящее изобретение относится к общему способу облагораживания отходов молочной промышленности до набора продуктов с высокой добавленной стоимостью, имеющих широкое применение в качестве пищевых ингредиентов.

Получение корма для животных из AW

Продукция белка является естественным компонентом жизненного цикла дрожжей и может составлять округленно 40% сухой массы в определенных условиях (Yamada et al., 2005). Продукция липидов, с другой стороны, зависит от конкретных пищевых стимулов и обычно является зависимой от фазы роста (Goncalves et al., 2014). На ранних стадиях ферментации, большая часть энергии и углерода используется для роста и деления клеток, но по мере того, как необходимые питательные вещества начинают заканчиваться (особенно азот), клетки прекращают делиться и вместо этого начинают хранить избыток углерода в форме липидов, которые секвестрированы в большие внутриклеточные капли. В определенных условиях, эти липидные тельца могут представлять более чем две трети сухой массы клетки к концу ферментации (Qiao et al., 2015). В случае AW, доступный азот находится, в первую очередь, в форме молочного белка, и доступ *Yarrowia* к этому источнику азота можно изменять для получения продукта с более высоким или более низким процентом массы, представляющим собой липиды.

Соотношение липида к белку контролировали посредством использования сконструированных штаммов *Yarrowia*. Использовали два штамма *Yarrowia*; W29

(несконструированный), продуцирующий смесь липидов и клеточной массы, так же как сконструированный штамм, обозначенный ACC-DGA. Штамм ACC-DGA был сконструирован для продукции большого количества липидов посредством сверхэкспрессии нативных генов *Yarrowia*, которые кодируют ферменты, вовлеченные в биосинтез триацилглицерина (Tai et al., 2013; Патентная заявка США No. US20130143282A1). Эти штаммы также отличались по их способности потреблять белок, присутствующий в AW. ACC-DGA имел недостаточность продукции секретируемых протеаз, и таким образом, являлся неспособным к деградации молочных белков. Начиная с этих двух штаммов, получали продукт либо с высоким содержанием жира, либо с высоким содержанием белка, или смесь из двух.

Пример 2. Превращение отходов молочной промышленности в пищевые и кормовые ингредиенты

Для расширения технологии утилизации AW и трансформации ее в платформу для получения ценных пищевых и кормовых ингредиентов, проводили поиск сконструированного штамма *Y. lipolytica*, способного к продукции ликопина в качестве модельного соединения природных продуктов из AW. Наблюдали, что ликопин мог впоследствии служить предшественником других каротеноидов, таких как α - и β -каротин, лютеин и астаксантин (ФИГ. 2). Ранее опубликованы попытки улучшения продукции β -каротина и астаксантина, в основном, посредством использования модельных микроорганизмов *E. coli* и *S. cerevisiae*. Рекомбинантное получение α -каротина и лютеина в грибах, однако, не было опубликовано. Кроме того, на основании предшествующей работы, было показано, что экспрессия секретируемой внеклеточной β -галактозидазы, совместно с экспрессией генов для ускорения нативного пути метаболизма галактозы, придают *Y. lipolytica* способность потреблять все сахара в AW (ФИГ. 1А-1С и ФИГ. 3). Таким образом, этот утилизирующий AW штамм являлся отличной исходной точкой для использования в качестве основы для последующих стадий конструирования (ФИГ. 3).

Для достижения этой цели, сначала, можно определять наилучшую комбинацию ферментов биосинтеза каротеноида, которые могут максимизировать продукцию каротеноида и накопление в клетках *Yarrowia*. Для дальнейшего улучшения, различные способы субклеточной локализации можно использовать для идентификации оптимальной совместной локализации ферментов в субклеточных органеллах, подобных эндоплазматическому ретикулуму, пероксисоме и липидным тельцам. Ферменты, локализованные в различных субклеточных компартментах, могут иметь более высокую активность для превращения субстратов, также локализованных в том же компартменте. Наконец, нативный путь мевалоната может быть сконструирован посредством сверхэкспрессии хорошо известных лимитирующих скорость ферментов для увеличения снабжения предшественниками каротеноидов.

Обратный осмос являлся общеупотребительным для концентрирования AW до меньших объемов, для уменьшения стоимости переработки и транспортировки отходов. Высокая концентрация молочной кислоты в концентрированной AW может ингибировать

рост *Y. lipolytica*. Таким образом, можно проводить поиск способов усиления толерантности *Y. lipolytica* к молочной кислоте посредством сверхэкспрессии ферментов, вовлеченных в потребление молочной кислоты. Этот способ можно дополнять посредством конструирования путей защиты от окислительного стресса, на основании предшествующей работы, где синтез липидов улучшали в *Y. lipolytica* (Xu et al., 2017). Все сконструированные штаммы можно подтверждать в биореакторах большего объема 10 л. Другим способом может являться исследование полногеномного ответа *Y. lipolytica* на концентрированную АW, которое может помочь понять геномную основу толерантности к концентрированной АW. Транскрипционный анализ может оценивать полногеномный ответ и позволять идентификацию генов, центральных для придания толерантности, вместе с потенциальными механизмами, лежащими в основе улучшенной толерантности штамма. С использованием сконструированных штаммов, описанных в предшествующих целях в качестве исходной точки, можно использовать способы полногеномной эволюционной инженерии, и мутанты с улучшенной толерантностью можно выделять. Специфические для штамма генетические различия и различия глобальной экспрессии генов мутантов можно идентифицировать с использованием «мультиомных» анализов (геномики и транскриптомики) и получать информацию для рациональной инженерии штамма-хозяина.

Кроме того, ТЕА можно использовать для оценки потенциальной осуществимости предложенного биопроцесса и для идентификации связанных с процессом и экономических лимитирующих факторов и мишеней для дальнейшего исследования и улучшения. Оценка общей стоимости предложенной технологии может предоставлять полезную информацию для потенциальных инвесторов. Моделирование процесса можно проводить с использованием имитатора процесса. Оценка с точки зрения окружающей среды предложенного биопроцесса является другим аспектом, который можно учитывать для идентификации критических для окружающей среды параметров биопроцесса и фокусировки на них (Heinzle et al., 1998).

Дополнительная работа также включает оптимизацию способа ферментации и очистки каротеноидных продуктов. Как внутриклеточные продукты, каротеноиды являются секвестрированными внутри клеток и должны быть экстрагированы и очищены из клеточной биомассы. Способ экстракции может первоначально включать стадию предварительной обработки, способствующую разрушению клеточной стенки. После этого, благодаря их липофильному характеру, каротеноиды экстрагируют общепринятым способом с использованием органических растворителей. Способ может включать стадии промывки, стадию кристаллизации и удаление следовых количеств растворителя посредством вакуумной сушки. Во время экстракции каротеноидов, проблемой является их чувствительность к избытку тепла, свету, кислотам и длительным периодам времени экстракции. Однако, следует отметить, что разделение и очистку каротеноидов можно осуществлять, следуя разработанным технологиям, которые можно лицензировать и разворачивать в интегрированной схеме АW-до-каротеноидов.

Пример 3. Нацеливание пути экспрессии на субклеточные органеллы улучшает синтез астаксантина в *Yarrowia lipolytica*

Конструирование микроорганизмов для сверхпродукции высокоценных природных продуктов было в большой степени сфокусировано на манипуляциях с метаболическими путями в клеточной цитоплазме. Недавно возник растущий интерес к распределению каналов метаболических путей в субклеточных органеллах дрожжей, таким образом, увеличению локальных концентраций субстрата и фермента, и улучшению эффективности компартментализованных путей и продукции конечного продукта (Cao et al., 2020; Hammer and Avalos, 2017). По сравнению с общепринятыми модельными дрожжами *S. cerevisiae*, систематическое исследование клеточных компартментов в жиरोобразующих дрожжах *Y. lipolytica* для биосинтеза природных продуктов запаздывало. Это происходит, несмотря на значительную роль, играемую внутриклеточными компартментами, подобными LB, ER и пероксисомой этих дрожжей. В настоящем исследовании, гетерологичный метаболический путь для синтеза астаксантина был собран с использованием слитых ферментов CrtW-Z и нацеливания экспрессии на субклеточные органеллы *Y. lipolytica*. Настоящее изобретение относится к приведению в тесную близость предшественника синтеза астаксантина с ферментами, катализирующими реакции пути. Поскольку *Y. lipolytica* широко рассматривают в качестве модельного организма для продукции происходящих из ацетил-СоА соединений (Abdel-Mawgoud et al., 2018), для других продуктов, происходящих из такого же предшественника, можно получать преимущества из этого исследования.

В первом цикле экспериментов получали выгоду от липофильного характера главного предшественника синтеза астаксантина, β -каротина, и осуществляли нацеливание на липофильный компартмент липидных телец для экспрессии пути астаксантина. После успешного воплощения этого способа, следующим осуществляли нацеливание на компартмент синтеза β -каротина, ER, и это дополнительно увеличивало продукцию. Наконец, осуществляли нацеливание также на пероксисому для компартментализации, из-за того, что она также служила в качестве хранилища для липофильных соединений. При нацеливании пути астаксантина на все три компартмента получали наилучшие результаты в отношении накопления продукта, что позволяет предполагать, что приведение пути астаксантина в тесную близость с предшественником β -каротина и предоставление подходящего носителя для хранения астаксантина все являлись важными для улучшения накопления продукта в *Y. lipolytica*. При одновременном нацеливании зависимого от CrtW-Z пути на LB, ER и пероксисому получали наиболее высокий титр астаксантина, опубликованный до настоящего времени для дрожжей. Таким образом, использование субклеточных органелл может являться многообещающим способом для дальнейшего улучшения биосинтеза изопреноидов, благодаря его потенциальному преимуществу улучшения снабжения предшественником и доступности кофакторов.

В общем, по настоящему изобретению успешно использовали слияние фермента и его компарментализацию в субклеточных органеллах, эффективное распределение каналов субстрата или промежуточных соединений для конечного продукта. Эти способы являются одними из первых в разработке субклеточной клеточной фабрики для дрожжей. Гидрофобность использовали в качестве ключевого свойства в конструировании пути астаксантина, но другие молекулярные признаки также можно использовать в разработке будущих применений инженерии органелл.

Скрининг комбинаций ферментов кетолазы и гидроксилазы β -каротина

Путь биосинтеза астаксантина был интенсивно исследован и является хорошо охарактеризованным. Как показано на **ФИГ. 4**, глюкоза превращается в предшественники изопентенилпирофосфат (IPP) и его изомер диметилаллилпирофосфат (DMAPP) посредством гликолитического пути и пути мевалоната (MVA). После этого, IPP и DMAPP конденсируют с образованием геранилгеранилдифосфата (GGPP) посредством синтазы GGPP. Затем GGPP превращают в астаксантин посредством гетерологичных ферментов, составляющих нижестоящий путь от GGPP до астаксантина. Гетерологичный путь для синтеза астаксантина можно, таким образом, разделить на два модуля: вышестоящий модуль от GGPP до β -каротина и нижестоящий модуль от β -каротина до астаксантина (**ФИГ. 4**). В предшествующем исследовании, штамм *Y. lipolytica* был сконструирован таким образом, что вышестоящий путь являлся способным к сверхпродукции β -каротина. Это осуществляли посредством введения в *Y. lipolytica* *rol1* генов для пути биосинтеза β -каротина: синтазы GGPP из *Sulfolobus acidocaldarius* (GGPPsa), гена для бифункционального фермента фитоенсинтазы/бета-ликопинциклазы (CarRP) и гена для фитоендегидрогеназы (CarB) из *Mucor circinelloides*. В этом продуцирующем β -каротин штамме ауксотрофные маркеры удаляли посредством системы Cre-loxP, позволяя следующий цикл геномной интеграции. Таким образом, получали являющийся основой штамм-хозяина, способный к сверхпродукции субстрата β -каротина для синтеза астаксантина.

Нижестоящий путь биосинтеза астаксантина из β -каротина конструировали посредством экспрессии гена *CrtW*, кодирующего β -каротинкетолазу, и гена *CrtZ*, кодирующего β -каротингидроксилазу, которые осуществляют добавление двух кето-групп и гидроксила, соответственно, изменяя цвет колоний с желтого на красный (**ФИГ. 5A**). Намного более высокий титр β -каротина, по сравнению с титром астаксантина, получали при гетерологичной экспрессии *CrtZ/W*, что позволяет предполагать, что кетолизация и гидрокселирование β -каротина являлись лимитирующими скоростью стадиями в синтезе астаксантина (Kildegaard et al., 2017). При первой попытке конструирования пути астаксантина, *CrtW* из морской бактерии видов *Paracoccus* (*PsCrtW*) и *CrtZ* из энтеробактерий *Pantoea ananatis* (*PaCrtZ*) (Kildegaard et al., 2017) вводили в продуцирующий β -каротин штамм YL00. Это приводило к выходу 6,1 мг/л астаксантина после 72 часов культивирования (**ФИГ. 5B**). Низкий выход мог быть обусловлен дисбалансом ферментативных активностей, что приводило в результате к накоплению

промежуточных соединений. Известно, что бактериальные CrtW и CrtZ могут использовать β -каротин, так же как его кетонные и гидроксированные продукты, в качестве субстрата, что приводит к разнообразным профилям каротеноидных промежуточных соединений, которые могут оказывать сильное влияние на выход астаксантина и продуктивность (Chang et al., 2015; Choi et al., 2005; Wang et al., 2017). Таким образом, из-за субстратных предпочтений и несбалансированных ферментативных активностей, оптимальная комбинация активности кетолазы и гидроксилазы β -каротина является критической для улучшенного накопления астаксантина.

Для дальнейшего улучшения гетерологичного пути, использовали кетолазы и гидроксилазы β -каротина из разнообразных организмов в качестве источников. Принимая во внимание, что основными природными источниками для синтеза астаксантина являются бактерии и водоросли, две дополнительные CrtW и две CrtZ были специфически отобраны посредством скрининга из таких организмов (**таблица 1**). Для идентификации пары CrtW/Z, которая максимизирует микробную продукцию астаксантина, проводили комбинаторный скрининг набора из трех CrtW и трех CrtZ в сверхпродуцирующем β -каротин штамме. Титры астаксантина, лежащие в диапазоне от 3,2 до 9,9 мг/л, получали с использованием различных сконструированных штаммов (**ФИГ. 5B**), что показывает, что сбалансированные ферментативные активности являлись необходимыми для реконструкции эффективного пути для продукции астаксантина. Оптимальной комбинацией CrtW/Z, приводящей к наиболее высокой продукции астаксантина, являлась комбинация из PsCrtW/HpCrtZ (**ФИГ. 5B**). Следует отметить, что для всех штаммов, несущих PsCrtW, показана намного лучшая продуктивность, чем для штаммов, несущих другие два CrtW (**ФИГ. 5B**). Кроме того, HpCrtZ, фермент из эукариотических организмов, впервые хорошо экспрессировали в *Y. lipolytica* и получали высокий уровень продукции астаксантина (**ФИГ. 5B**).

Продукцию астаксантина улучшают посредством слитых ферментов

В зависимости от порядка, в котором проводили реакции кетолиза и гидроксирования в способе биосинтеза от β -каротина до астаксантина, синтезировали несколько промежуточных соединений, формируя множество путей от β -каротина до конечного продукта (**ФИГ. 6A**). Несмотря на то, что сконструированный штамм YL02, несущий оптимизированную комбинацию CrtW и CrtZ, улучшал продукцию астаксантина, более высокие уровни могут являться возможными посредством превращения других промежуточных соединений, которые также накапливались, особенно эхиненона, кантаксантина и зеаксантина (**ФИГ. 6B**). Характер накопленных промежуточных соединений позволял предполагать, что превращение кантаксантина или зеаксантина в астаксантин являлось лимитирующими факторами пути. Выдвинули гипотезу, что эти лимитирующие факторы были вызваны низкими концентрациями метаболитов поблизости от ферментов CrtZ/CrtW и могли, таким образом, быть удалены посредством сокращения расстояния между ферментами и их субстратами. Увеличение физической близости между CrtW и CrtZ могло минимизировать расстояние субстрат-фермент и увеличивать скорости

реакции. Для тестирования этой гипотезы, получали активные продукты слияния между ферментами CrtW и CrtZ, с целью улучшения контакта продуктов/предшественников с соответствующими ферментами посредством создания более близкого микроокружения.

β -каротинкетолаза из видов *Paracoccus* (PsCrtW) и β -каротингидроксилаза из *Haematococcus pluvialis* (HrCrtZ) были выбраны для получения слитых ферментов на основании их высокой активности для получения большего количества астаксантина при индивидуальной экспрессии (**ФИГ. 5B**). Эти два белка экспрессировали как трансляционные продукты слияния, разделенные линкерным спейсером, введенным для поддержания двух ферментов в тесной близости и одновременно позволяющим взаимодействие между доменами (Nogueira et al., 2019). Две конструкции исследовали посредством экспрессии продуктов слияния, так же как контроля для них в сверхпродуцирующем β -каротин штамме YL00, соответственно (**ФИГ. 6C**). Уровни астаксантина и промежуточных соединений в сконструированных штаммах измеряли и показали, что сконструированные штаммы, экспрессирующие продукты слияния ферментов CrtZ-W или CrtW-Z, оба могли продуцировать увеличенные количества астаксантина (**ФИГ. 6C** и **ФИГ. 9**), что позволяло предполагать, что оба слитых фермента функционировали сходным образом, но являлись более активными, чем соответствующие индивидуально экспрессируемые ферменты. По сравнению с контрольными штаммами, несущими индивидуальные ферменты CrtW+Z, продукция астаксантина с использованием штаммов со слитыми ферментами являлась значимо улучшенной и увеличенной в 2,2 раза в штамме со слитым CrtZ-W, вплоть до 22,8 мг/л, и в 2,8 раз в штамме со слитым CrtW-Z, вплоть до 28,9 мг/л (**ФИГ. 6C**). Это предоставляло поддержку гипотезы, что значительное улучшение штаммов со слитым ферментом являлось, вероятно, обусловленным улучшенной близостью субстрат-фермент и их взаимодействиями. Интересно, что для штамма, экспрессирующего слитый CrtW-Z, показана улучшенная продуктивность, по сравнению со штаммом со слитым ферментом CrtZ-W (**ФИГ. 6C**), что позволяет предполагать, возможно, более высокую каталитическую активность, когда CrtW был расположен на N-конце слитого фермента. Следует отметить, что профили метаболитов штаммов со слитым ферментом являлись отличными от профилей для индивидуальных ферментов. Накопление промежуточных соединений являлось уменьшенным для штаммов со слитым ферментом, особенно кантаксантина и зеаксантина (**ФИГ. 6B** и **ФИГ. 9**). Это позволяет предполагать более быстрое превращение кантаксантина и зеаксантина в астаксантин, придаваемое слитыми ферментами. Неожиданно, промежуточное соединение 3'-гидроксиэхиненон значительно накапливалось в штаммах со слитым ферментом (**ФИГ. 6B** и **ФИГ. 9**). Хотя слитые ферменты являлись более эффективными для продукции астаксантина, по сравнению с индивидуальными ферментами, накопление промежуточных соединений не было эффективно устранено. Таким образом, важной задачей являлось исследование путей для максимизации потока от β -каротина до синтеза астаксантина, без накопления промежуточного соединения.

Нацеливание слитых ферментов на субклеточный компартмент улучшает биосинтез астаксантина

Хроматографические профили каротеноидов, синтезированных штаммом, несущим слитый фермент CrtW-Z (**ФИГ. 6B**), показало, что предшественник β -каротин, совместно с кетокаротеноидными промежуточными соединениями (эхиненоном, 3'-гидроксиэхиненоном и зеаксантином) накапливался, таким образом, препятствуя потоку углерода к синтезу астаксантина. Для уменьшения образования этих промежуточных соединений, эффект увеличения количества копий для пути биосинтеза астаксантина исследовали посредством введения дополнительной копии слитого фермента CrtW-Z в продуцирующий астаксантин штамм YL11, получая штамм YL12. Это, однако, не влияло на количество продуцированного астаксантина (**ФИГ. 10A**), и накопление промежуточных соединений оставалось в большой степени неустраненным (**ФИГ. 10B**). Это привело к гипотезе, что неэффективная продукция астаксантина, вероятно, обусловлена секвестрацией предшественника β -каротина внутри липидных капель, где к ним нет легкого доступа для цитозольных ферментов, превращающих их в астаксантин.

Липидные тельца (LB) в *Y. lipolytica* действительно образуют гидрофобные карманы, которые могут секвестрировать предпочтительно липофильные изопреноидные соединения. Поскольку предшественник астаксантина β -каротин является такой липофильной молекулой, исследовали, может ли его секвестрация в LB (**ФИГ. 11**), влиять на продукцию астаксантина. Выдвинули гипотезу, что нацеливание пути астаксантина на LB может ускорять превращение β -каротина в астаксантин посредством большей физической близости между ферментом и субстратом. С этой целью, использовали хорошо охарактеризованные N-концевые сигналы локализации, способные к нацеливанию белков на LB (Yang et al., 2019). Слитый фермент CrtW-Z нацеливали на LB посредством его соединения с последовательностью метки для локализации белка олеозина (**ФИГ. 7A**), таким образом, предоставляя альтернативный биологический способ биосинтеза астаксантина. Как ожидали, для штамма YL13 с нацеливанием на LB получили титр 46,8 мг/л астаксантина, увеличение в 1,62 раз, по сравнению с контрольным штаммом, экспрессирующим путь в цитозоле (**ФИГ. 7D**). Наиболее примечательно, накопление β -каротина, так же как кетокаротеноидных промежуточных соединений, уменьшалось (**ФИГ. 7B-7C**).

Под влиянием этих результатов, использовали участок синтеза β -каротина в клетках. Прогнозирование трансмембранных спиралей в гетерологичных белках, ассоциированных с биосинтезом β -каротина (GGPPsa, CarB и CarRP), выявило, что, за исключением GGPPsa, два других фермента имели трансмембранные спирали (**ФИГ. 12A-12C**), что позволяло предполагать, что CarB и CarRP являлись локализованными в субклеточных органеллах. Для исследования участка субклеточной локализации этих трех белков, использовали флуоресцентный анализ по совместной локализации слитого белка с GFP, и обнаружили, что CarB и CarRP оба являлись локализованными в эндоплазматическом ретикулуме (ER), в то время как GGPPsa являлся локализованным в

цитозоле (**ФИГ. 13**). Это показывало, что биосинтез β -каротина происходил по большей части в ER, в согласовании с синтезом триацилглицеридов (TAG), которые синтезируются в ER и далее агломерируют в LB (**ФИГ. 7A**) (Xu et al., 2016). Таким образом, ER может предоставлять другую потенциальную мишень для компартиментализации путей астаксантина.

Помимо LB и ER, другой органеллой, потенциально влияющей на внутриклеточное накопление β -каротина, является пероксисома, которая также служит в качестве компартмента хранения для липофильных соединений (Liu et al., 2020). Таким образом, путь астаксантина нацеливали, как экспрессировали посредством слитого фермента CrtW-Z, на ER и на пероксисому посредством слияния с хорошо охарактеризованной нацеливающей последовательностью KDE1 и SKL, соответственно (**ФИГ. 7A**). Как ожидали, штамм с нацеливанием на соответствующую органеллу значительно увеличивал титр астаксантина, по сравнению со штаммом с цитозольным путем экспрессии (**ФИГ. 7B-7D**). Для штамма YL14, несущего сконструированный нацеленный на ER путь, получали 53,2 мг/л астаксантина после 72 час культивирования, представляющее увеличение в 1,84 раз, относительно его цитозольных эквивалентов (**ФИГ. 7D**). Соответствующий штамм YL15 с нацеливанием на пероксисому продуцировал приблизительно 58,7 мг/л астаксантина, увеличение в 2,03 раз, по сравнению со штаммом YL11 с цитозольным путем экспрессии (**ФИГ. 7D**).

С учетом того, что значительная фракция пула β -каротина находится в ER, LB и пероксисоме, исследовали нацеливание пути на более чем один компартмент. Обнаружили, что при одновременном нацеливании слитого фермента CrtW-Z на LB и ER, титр астаксантина являлся значимо увеличенным, по сравнению с титром для одиночной субклеточной компартиментализации (**ФИГ. 7D**). Примечательно, что лимитирующий фактор, проявляющийся посредством накопления β -каротина и кетокаротеноидных промежуточных соединений, был эффективно ослаблен (**ФИГ. 7B-7D**). Кроме того, титр астаксантина являлся дополнительно увеличенным, вплоть до 139,4 мг/л, в штамме YL17 с тройной инженерией органелл, с дополнительным CrtW-Z, локализованным в пероксисоме (**ФИГ. 7D**). В совокупности, эти результаты поддерживают то, что компартиментализация не только делает промежуточные соединения доступными для нижестоящих сконструированных биокатализаторов, но также увеличивает каталитическую активность ферментов, благодаря уникальным физиохимическим окружениям.

Оптимизация условий превращения для максимизации превращения β -каротина в астаксантин

Затем исследовали эффект состава среды на продукцию астаксантина. Концентрацию глюкозы изменяли, в то же время сохраняя постоянным количество азота, таким образом эффективно изменяя соотношение C/N среды. Наблюдали большие изменения в продукции астаксантина, в зависимости от исходной концентрации глюкозы. Обнаружили, что титр астаксантина постепенно увеличивался с увеличением

концентрации глюкозы, и достигал наивысшего уровня для среды YPD40 (ФИГ. 8А). Однако, выходы астаксантина уменьшались с увеличением исходной концентрации глюкозы (ФИГ. 8А). Кроме того, наблюдали явную положительную корреляцию между исходным содержанием глюкозы и накоплением промежуточных соединений, включая β -каротин и кетокаротеноидные промежуточные соединения, (ФИГ. 14). Это можно, возможно, отнести к увеличенному содержанию липидов, возникающему в результате более высокого соотношения C/N, и это, в свою очередь, приводит к большему количеству β -каротина, секвестрированного в липидном тельце (Larroude et al., 2018), где нацеленный на LB фермент оказался ограниченным, таким образом, приводя в результате к накоплению промежуточных соединений. На основании этих результатов, среда YPD20 была выбрана для демонстрации продукции астаксантина в периодической ферментации с подпиткой. Для штамма YL17 достигали общий титр астаксантина и содержание 858 мг/л и 16,7 мг/г DCW, соответственно, в периодической ферментации с подпиткой в колбе (ФИГ. 8В), которые являлись наиболее высокими, опубликованными до настоящего времени для дрожжей. Кроме того, продуктивность сконструированных штаммов оценивали посредством масштабирования ферментации до 3 л биореакторов. Но был получен титр только 453 мг/л астаксантина (ФИГ. 8С), что предполагает дальнейшую оптимизацию ферментации в ферментере, необходимую в будущем.

Заякоривание ферментов одновременно во всех трех органеллах приводило к наибольшему увеличению синтеза астаксантина, и в конечном счете, продуцированным 858 мг/л астаксантина в периодической ферментации с подпиткой (улучшение в 141 раз, по сравнению с исходным штаммом). Ожидают, что способы и продукты, описанные в настоящем описании, помогут раскрыть полный потенциал субклеточных компартментов и продвигать основанный на LB компартментализованный биосинтез изопреноидов в *Y. lipolytica*.

Как описано выше, настоящее изобретение относится к экспрессии слитыми двух ключевых ферментов в пути астаксантина и к продуктивности продукта слияния при нацеливании на различные субклеточные компартменты. Оценивали активность ключевых ферментов кетолазы (CrtW) и гидроксиллазы (CrtZ) β -каротина из различных источников и обнаружили, что пара PsCrtW/HpCrtZ (полученных в качестве источника из видов *Paracoccus* и *Haematococcus pluvialis*, соответственно) являлась наилучшей для накопления астаксантина. Активность PsCrtW и HpCrtZ комбинировали посредством получения слитого фермента, чтобы преодолевать утечку неэндогенных промежуточных соединений. Наконец, вышеуказанный путь биосинтеза астаксантина из слитых ферментов нацеливали на субклеточный компартмент липидного тельца (LB), отдельно и в комбинации с компартментализацией в эндоплазматическом ретикулуме (ER) и пероксисоме. Относительно цитозольного пути, распределение каналов пути астаксантина в органеллах приводило к значимому увеличению продукции, так же как к уменьшению накопления промежуточных соединений. Кроме того, одновременное нацеливание пути астаксантина на все три LB, ER и пероксисому приводило к наиболее высокой продукции

астаксантина, и в конечном счете, достигали 858 мг/л (16,7 мг/г DCW) в периодической ферментации с подпиткой. Эти результаты показали потенциал *Y. lipolytica* для продукции липофильных метаболитов посредством нацеливания пути экспрессии на субклеточные компартменты, что позволяет эффективное функционирование биосинтетических путей.

Эти способы, описанные в настоящем описании, задействовали для максимизации продукции каротеноида атаксантина в *Y. lipolytica*. Сначала получали функциональные продукты слияния кетолазы и гидроксилазы β-каротина (CrtW-Z или CrtZ-W) и показали для них повышение продукции атаксантина, по сравнению с уровнем, достигнутым посредством индивидуально экспрессированных ферментов (CrtW+Z) в *Y. lipolytica*. Наибольшим различием между индивидуально экспрессированными и слитыми ферментами, в отношении накопления промежуточных соединений, являлись профили кантаксантина и зеаксантина в штамме CrtW+Z, в то же время, 3'-гидроксиэхиненона в штамме CrtW-Z. Кантаксантин или зеаксантин синтезируют из β-каротина за две ферментативные стадии, требующие только CrtW или CrtZ, соответственно, в то время как продукция 3'-гидроксиэхиненона требует участия обоих ферментов. Это количественное изменение состава промежуточных соединений между штаммами CrtW+Z и CrtW-Z может указывать на то, что кантаксантин и зеаксантин более просто превращаются в нижестоящие метаболиты, когда оба фермента являются слитыми. Уменьшение утечки промежуточных соединений и ускорение общих скоростей реакции подчеркивает улучшение взаимодействия ферментов, когда они слиты вместе.

Пример 4. Материалы и способы, относящиеся к примеру 3

Условия культивирования и среда

Клетки *Escherichia coli* DH5α выращивали в среде Луриа-Бертани (LB) (BD bioscience) при 37°C с постоянным встряхиванием. Соответствующие антибиотики (100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина) добавляли для отбора плазмид. Все штаммы *Y. lipolytica* культивировали при 30°C с встряхиванием при 230 об./мин. Для *Y. lipolytica*, использовали среду YPD, состоящую из 10 г/л дрожжевого экстракта (BD bioscience), 20 г/л пептона (BD bioscience) и 20 г/л глюкозы (Sigma-Aldrich). Кроме того, среду YNB, состоящую из 1,7 г/л базовой азотной среды для дрожжей (YNB, VWR Life Science), 20 г/л глюкозы, 5 г/л сульфата аммония, 15 г/л агара (BD bioscience) и 0,77 г/л подходящей полной смеси добавок без урацила, лейцина или триптофана (Sunrise science products), использовали для отбора трансформированных штаммов *Y. lipolytica*.

Конструирование плазмид и штаммов

E. coli DH5α использовали для клонирования и размножения плазмид. Штамм *Y. lipolytica* rolf служил в качестве базового штамма, и все сконструированные производные и плазмиды перечислены в **таблице 2**. Праймеры, используемые для конструирования плазмид, показаны в **таблице 3**. Все рестрикционные ферменты были закуплены из New England Biolabs (NEB). Амплификацию ПЦР проводили с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (NEB) или ДНК-полимеразы GoTaq (Promega). Фрагменты после ПЦР очищали с использованием набора для выделения фрагментов ZYMO Fragment

Recovery Kit (ZYMO research). Затем плазмиды конструировали из очищенных фрагментов после ПЦР с использованием набора для сборки по Гибсону Gibson Assembly kit (NEB), трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* посредством теплового шока, и выделяли с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Все способы осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Все сконструированные штаммы *Y. lipolytica* конструировали посредством трансформации линейаризованными плазмидами (с расщеплением Not1) с использованием литий-ацетатного способа. Рекомбинанты подтверждали посредством амплификации ПЦР из геномной ДНК. Гены биосинтеза астаксантина, оцениваемые в этом исследовании, все были оптимизированы по кодонному составу для *Y. lipolytica*.

Избавление от ауксотрофного маркера посредством системы Cre-loxP

Плазмидой pYLMA-Cre трансформировали целевые штаммы *Y. lipolytica* для удаления маркеров *URA3*, *LEU2* и *TRP1*. Трансформанты отбирали на чашке с агаром с YPD, дополненной конечной концентрацией 250 мг/л гигромицина В (Sigma-Aldrich). После 2-3 суток культивирования, колонии переносили на новую чашку с YPD, содержащую гигромицин В, еще на 1 сутки, чтобы позволить более успешные делеции маркеров. Удаление маркеров подтверждали посредством субкультивирования колоний на чашках с агаром с YNB-Ura, YNB-Leu и YNB-Trp, соответственно. Успешное удаление всех трех маркеров приводило к фенотипу, придающему недостаточность урацила, лейцина и триптофана. Затем плазмиду pYLMA-Cre в клетках удаляли посредством инкубации положительных штаммов на чашках с агаром с YPD при 30°C в течение 24 часов, с 2-3 повторами.

Ферментация в встряхиваемой колбе

Отдельные колонии рекомбинантных штаммов отбирали с чашки, инокулировали в 2 мл среды YPD и культивировали в течение ночи (16-18 часов) при 30°C и 230 об./мин. Затем культуру переносили в 50 мл встряхиваемую колбу, содержащую 10 мл среды YPD (исходная OD₆₀₀=0,1) и культивировали при 30°C и 230 об./мин в течение 3 суток.

Количественная оценка остаточной глюкозы в средах

500 мкл образца извлекали из культуры для количественной оценки остаточной глюкозы. Клетки центрифугировали при 12000 об./мин в течение 5 минут, и затем супернатант фильтровали через 0,2 мкм шприцевые фильтры до инъекции в устройство для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) Agilent technologies 1260, оборудованное детектором показателя преломления. Колонку Bio-Rad HPX-87H использовали для разделения с использованием 14 мМ серной кислоты в качестве подвижной фазы, протекающей со скоростью 0,7 мл/минуту. Объем инъекции составлял 10 мкл. Температура колонки составляла 50°C.

Экстракция каротеноидов

Экстракцию каротеноидов проводили, как описано (Asker, 2017) с следующей модификацией. Кратко, 50~100 мкл культуры центрифугировали в течение 1 минуты при 12000 g, и осадки клеток суспендировали в 900 мкл диметилсульфоксида (DMSO) до

нагревания при 50°C в течение 1 часа, пока клетки не обесцвечивались, в водяной бане. Экстракты DMSO быстро смешивали с 450 мкл метанола и центрифугировали при 14000 g в течение 5 минут. Полученные супернатанты переносили в стеклянные флаконы для анализа и количественной оценки каротеноидов.

Анализ и количественная оценка каротеноидов

Продукцию каротеноидов выражали как грамм на литр ферментационного бульона (г/л) и миллиграмм на грамм сухой массы клеток (мг/г DCW). Оптические плотности измеряли при 600 нм с использованием Thermo Spectronic Genesys 20 (Thermo Scientific) и использовали для расчета массы клеток ($DCW=0,30 \times OD_{600}$, **ФИГ. 15**). Анализ и количественную оценку астаксантина проводили посредством устройства для HPLC (SHIMADZU LC-20 AT), оборудованного колонкой Kromasil C18 (4,6 мм x 250 мм) и детекцией в УФ/видимой области спектра при 475 нм. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила-метанола-изопропанола (5:3:2 об./об.) со скоростью потока 1 мл/минуту при 40°C. Стандартные кривые астаксантина (Sigma-Aldrich) получали посредством осуществления такого же способа экстракции, как для образцов.

Нацеливание биосинтетических путей на субклеточные компартменты

Зависимые от слитого фермента CrtW-Z пути биосинтеза астаксантина нацеливали на различные субклеточные компартменты (ER, LB и пероксисому) с использованием специфических сигналов адресации. Ферменты, вовлеченные в путь биосинтеза астаксантина, направляли на ER посредством добавления С-концевого KDEL, с использованием следующей нуклеотидной последовательности 5'-AAGGACGAGCTG-3' (SEQ ID NO: 6), в то же время удаляя стоп-кодон с конца сигнала нацеливания. Сходным образом, нацеливание белков на пероксисому или LB обеспечивали посредством добавления SKL (нуклеотидной последовательности 5'-TCCAAGCTG-3') или олеозина из *Zea mays* (оптимизированные по кодонному составу последовательности олеозина перечислены в **таблице 4**), как ранее осуществляли в других работах по инженерии *Y. lipolytica* (Yang et al., 2019). Слитый фермент CrtW-Z без какого-либо сигнала нацеливания направляли на цитоплазму.

Периодическая ферментация с подпиткой

Периодическую ферментацию с подпиткой в биореакторе проводили в 3 л ферментере (система New Brunswick Bioflo115). Начальную ферментацию проводили в 1 л среды, содержащей 100 г/л глюкозы, 100 г/л пептона и 50 г/л дрожжевого экстракта. Температуру поддерживали при 30°C. Растворенный кислород контролировали при 20% насыщения с использованием каскада встряхивания при 250~800 об./мин. Воздух барботировали в ферментер при 2 об./об./мин. pH поддерживали при 6,8 посредством подпитки 5 М NaOH или 5 М HCL. Пенообразование предотвращали посредством добавления противовспенивающего средства 204 (Sigma-Aldrich). Периодическое функционирование с подпиткой начинали после 72 часов культивирования с 15 x средой YPD. Образцы отбирали каждые 24 часа для измерения OD_{600} , концентраций глюкозы и астаксантина. Периодическую ферментацию с подпиткой в колбе проводили в 50 мл

конических колбах с рабочим объемом 10 мл среды YPD. 15 х средой YPD подпитывали каждые 48 часов, и pH не контролировали.

Таблица 1. Список кетолаз и гидроксилаз β-каротина, используемых в примере 3.

Фермент	Наименование, используемое в этом исследовании	Но. доступа	Организм
β-каротинкетолаза	BrCrtW	WP_152949584.1	<i>Brevundimonas</i>
	HpCrtW	Q39982.1	<i>Haematococcus phuvialis</i>
	PsCrtW	D58420.2	Виды <i>Paracoccus</i>
β-каротингидроксилаза	BrCrtZ	WP_054764844.1	<i>Brevundimonas</i>
	HpCrtZ	KP866868.1	<i>Haematococcus phuvialis</i>
	PaCrtZ	CRH37458.1	<i>Pantoea ananatis</i>

Таблица 2. Используемые штаммы и конструкции в примере 3.

Наименование штамма	Описание штаммов и плазмид	Источник
YLMA31	Продуцирующий β-каротин штамм	Лабораторный препарат для хранения
YL00	YLMA31, <i>ura⁻/leu⁻/trp⁻</i>	Пример 3
YL01	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>PsCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>PaCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL02	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>PsCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>HpCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL03	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>PsCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>BrCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL04	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>HpCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>PaCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL05	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>HpCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>HpCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL06	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>HpCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>BrCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL07	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>BrCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>PaCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL08	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>BrCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>HpCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL09	YL00, URA3:: T _{Lip1} - <i>BrCrtW</i> -P _{EXP1} +P _{TEFin} - <i>BrCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL10	YL00, URA3:: P _{TEFin} - <i>HpCrtZ</i> + <i>PsCrtW</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL11	YL00, URA3:: P _{TEFin} - <i>PsCrtW</i> + <i>HpCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL12	YL11, LEU2:: P _{TEFin} - <i>PsCrtW</i> + <i>HpCrtZ</i> -T _{XPR2}	Пример 3
YL13	YL00, URA3:: P _{TEFin} - <i>PsCrtW</i> + <i>HpCrtZ</i> +олеозин-T _{XPR2}	Пример 3
YL14	YL00, URA3:: P _{TEFin} - <i>PsCrtW</i> + <i>HpCrtZ</i> +KDEL-T _{XPR2}	Пример 3
YL15	YL00, URA3:: P _{TEFin} - <i>PsCrtW</i> + <i>HpCrtZ</i> +SKL-T _{XPR2}	Пример 3
YL16	YL14, LEU2:: P _{TEFin} - <i>PsCrtW</i> + <i>HpCrtZ</i> +олеозин-T _{XPR2}	Пример 3
YL17	YL16, TRP1:: P _{TEFin} - <i>PsCrtW</i> + <i>HpCrtZ</i> +SKL-T _{XPR2}	Пример 3

Таблица 3. Праймеры, используемые в примере 3.

Индивидуальные ферменты

BrCrtW-F	ATGAACCAGATGCATAGCACTTAAGACTCGCCTCGCCACA (SEQ ID NO: 7)
BrCrtW-R	ACACAAGACATATCTACAGCATGACCGCCGCTGTGGCTGA (SEQ ID NO: 8)
HpCrtW-F	ATGAACCAGATGCATAGCACTTAGGCCAGAGCGGGGACCA (SEQ ID NO: 9)
HpCrtW-R	ACACAAGACATATCTACAGCATGCACGTGGCCTCTGCTCT (SEQ ID NO: 10)
PsCrtW-F	ATGAACCAGATGCATAGCACTTAGGCGGTGTCGCCCTTAG (SEQ ID NO: 11)
PsCrtW-R	ACACAAGACATATCTACAGCATGTCTGCCACGCTCTGCC (SEQ ID NO: 12)
BrCrtZ-F	TTTTGCAGTACTAACC GCAGGCCTGGCTGACCTGGATCGC (SEQ ID NO: 13)
BrCrtZ-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTAGGCGCCAGAAGAAGAGG (SEQ ID NO: 14)
HpCrtZ-F	TTTTGCAGTACTAACC GCAGCTGTCTAAGCTGCAGTCTAT (SEQ ID NO: 15)
HpCrtZ-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTATCGCTTAGACCAGTCCA (SEQ ID NO: 16)
PaCrtZ-F	TTTTGCAGTACTAACC GCAGCTGTGGATCTGGAACGCCCT (SEQ ID NO: 17)
PaCrtZ-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTACTTGCCAGAGGCGGGCT (SEQ ID NO: 18)
Слитые ферменты	
HpCrtZ+PsCrtW-F1	TTTTGCAGTACTAACC GCAGCTGTCTAAGCTGCAGTCTAT (SEQ ID NO: 15)
HpCrtZ+PsCrtW-R1	CGGGTCCGCCAGAGCCTCCGCCGCCTCGCTTAGACCAGTCCAGCT (SEQ ID NO: 19)
HpCrtZ+PsCrtW-F2	CGGAGGCTCTGGCGGACCCGGCTCTATGTCTGCCACGCTCTGCC (SEQ ID NO: 20)
HpCrtZ+PsCrtW-R2	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTAGGCGGTGTCGCCCTTAG (SEQ ID NO: 21)
PsCrtW+HpCrtZ-F1	TTTTGCAGTACTAACC GCAGTCTGCCACGCTCTGCCCAA (SEQ ID NO: 22)
PsCrtW+HpCrtZ-R1	CGGGTCCGCCAGAGCCTCCGCCGCCTCGCTTAGACCAGTCCAGTC (SEQ ID NO: 23)
PsCrtW+HpCrtZ-F2	CGGAGGCTCTGGCGGACCCGGCTCTATGCTGTCTAAGCTGCAGTC (SEQ ID NO: 24)
PsCrtW+HpCrtZ-R2	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTATCGCTTAGACCAGTCCA (SEQ ID NO: 16)
Нацеливание ферментов на органеллы	
PsCrtW+HpCrtZ+олеозин-F1	TTTTGCAGTACTAACC GCAGTCTGCCACGCTCTGCCCAA (SEQ ID NO: 22)
PsCrtW+HpCrtZ+олеозин-R1	CGGGTCCGCCAGAGCCTCCGCCGCCTCGCTTAGACCAGTCCAGCT (SEQ ID NO: 19)
PsCrtW+HpCrtZ+олеозин-F2	CGGAGGCTCTGGCGGACCCGGCTCTATGGCCGACCGAGACCGAAG (SEQ ID NO: 25)
PsCrtW+HpCrtZ+олеозин-R2	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTAGGAGGAAGCTCGACCAC (SEQ ID NO: 26)
PsCrtW+HpCrtZ+	TTTTGCAGTACTAACC GCAGTCTGCCACGCTCTGCCCAA (SEQ ID NO: 22)

KDEL-F	ID NO: 22)
PsCrtW+HpCrtZ+ KDEL-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTACAGCTCGTCCTTTCGCTTAG ACCAGTCCAGCTCG (SEQ ID NO: 27)
PsCrtW+HpCrtZ+ SKL-F	TTTTGCAGTACTAACCAGCTCTGCCACGCTCTGCCCAA (SEQ ID NO: 22)
PsCrtW+HpCrtZ+ SKL-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTACAGCTTGGATCGCTTAGACC AGTCCAGCTCG (SEQ ID NO: 28)

Таблица 4. Оптимизированная по кодонному составу последовательность олеозина, используемая в примере 3.

ATGGCCGACCGAGACCGAAGCGGCATCTACGGCGGGCGCCACGCTACCTACGGCCAG CAGCAGCAGCAGGGCGGGCGGTGGTCGACCTATGGGCGAGCAGGTCAAGGGCATGCT GCACGACAAGGGCCCCACTGCCTCCCAGGCCCTCACCGTTGCCACCCTGTTCCCCCT GGGCGGCCTCCTTCTCGTGCTTTCGGTCTTGCCCTGACTGCCTCCGTGGTCGGCCTG GCTGTGCCACTCCCGTCTTCCCTCATCTTCTCCCCGTCCTCGTCCCCGCCGCCCTTCT TATCGGCACCGCCGTCATGGGCTTCCCTGACCTCTGGCGCCCTGGGCCTCGGCGGTCTT TCCTCTCTCACCTGCCTTGCCAACACCGCCCGACAGGCCTTTCAGCGAACCCCCGAC TACGTCGAGGAGGCCACCGACGAATGGCCGAGGCCGCTGCTCACGCCGGTCACAA GACCGCCCAGGCCGGACAGGCCATCCAGGGACGAGCCCAGGAGGCCGGTGCCGGTG GTGGTGCTGGTGCTGGAGCCGGAGGCGGTGGTTCGAGCTTCTCCTAA (SEQ ID NO: 29)

Таблица 5. Концентрация каротеноида, вовлеченная в путь астаксантина.

Штаммы	β -каротин (мг/л)	Эхиненон (мг/л)*	Кантаксантин (мг/л)*	3'-гидроксиэхиненон (мг/л)*	Зеаксантин (мг/л)*	Астаксантин (мг/л)
YL02	502,5	33,9	56,6	2,2	23,0	9,9
YL10	902,1	28,6	3,1	50,6	10,5	22,8
YL11	788,8	28,3	5,2	56,7	12,4	28,9
YL13	430,1	26,4	4,0	53,7	22,9	46,8
YL14	574,4	28,9	11,6	34,3	32,8	53,2
YL15	597,7	19,6	2,1	44	22,3	58,7
YL16	161,1	6,8	3,2	20,5	12,6	115,1
YL17	115,6	3,1	1,9	17,9	15,7	139,4

*Из-за отсутствия стандартных соединений, эти промежуточные соединения считали как эквивалент астаксантина.

Пример 5. Удаление ингибирования субстратом ликопином позволяет высокую продуктивность для каротеноида в *Yarrowia lipolytica*

Ингибирование субстратом ферментов может являться главным препятствием для продукции ценных химических веществ в сконструированных микроорганизмах. Ингибирование субстратом ликопинациклазы идентифицировано как главное ограничение биосинтеза каротеноидов в *Yarrowia lipolytica*. Для преодоления этого лимитирующего фактора, использовали два независимых способа. Посредством направляемой структурой белковой инженерии получили вариант Y27R, характеризующийся полной потерей

ингибирования субстратом без уменьшения ферментативной активности. Альтернативно, разработка опосредованного геранилгеранилпирофосфатсинтазой ограничителя притока потока также предотвращала начало ингибирования субстратом посредством отклонения метаболического потока от ингибирующего метаболита, с поддержанием в то же время достаточного потока для образования продукта. Оба способа являлись очень эффективными, приводя в результате к высоким уровням почти исключительной продукции β -каротина. В конечном счете, сконструировали штаммы, способные к продукции 39,5 г/л β -каротина с продуктивностью 0,165 г/л/час в ферментациях в биореакторе (улучшение в 1441 раза, по сравнению с исходным штаммом). Обнаружения, описанные в настоящем описании, обеспечивают эффективные способы удаления ингибирования субстратом в конструировании путей для эффективного синтеза природных продуктов.

Конструирование микроорганизмов для продукции ценных химических продуктов является привлекательной альтернативой получению этих соединений из природных источников или их получению из нефтехимических продуктов посредством химического синтеза (Chen and Nielsen., 2013; Li and Smolke, 2016; Liu and Nielsen, 2019). Однако, усилиям синтетической биологии для достижения экономически эффективных и масштабируемых титров и продуктивности часто препятствовали нежелательные регуляторные механизмы, модулирующие активность ферментов. Такие механизмы эволюционировали для опосредования оптимального клеточного ответа на изменение физиологических условий, но также представляют собой главное препятствие для перенаправления метаболических потоков к желательным сконструированным метаболическим путям и от нативных оптимизирующих рост путей. Эта проблема является особенно очевидной для соединений, требующих длинных и комплексных путей синтеза (например, изопреноидов), часто образующих лимитирующие факторы, которые могут уменьшать выносливость клеток и продуктивность пути (Wu et al., 2016; Keasling et al., 2010). Таким образом, является настоятельной необходимостью разработка способов, позволяющих обходить эффект ингибирования ферментом при конструировании активных штаммов с высокой продуктивностью.

Ингибирование субстратом представляет один такой вид регуляции на уровне фермента, задействованный в клетках, чтобы способствовать оптимизации клеточной экономии и максимизации роста в ответ на временные изменения окружающей среды (Reed et al., 2010). Кроме того, такой механизм часто используют для разработки видов терапии для различных заболеваний (Boutin et al., 2005; Belzer et al., 2013). Однако, он является нежелательным в промышленных применениях микроорганизмов, опосредованных ферментативными реакциями для синтеза продукта. Ингибирование фермента, как правило, запускается, когда концентрация субстрата превышает конкретный порог, таким образом, предотвращая каталитическое превращение субстрата и ограничивая поток через желательный путь. Таким образом, ингибирование субстратом является особенно неблагоприятным для синтеза представляющих интерес конечных

продуктов, когда присутствует в середине метаболического пути, что, в свою очередь, вызывает накопление промежуточных соединений, прерывание пути и изменение профиля образованных продуктов. Хотя исследовано несколько способов для устранения этого ограничения, таких как иммобилизация фермента (Singh et al., 2013; Matwo et al., 2004), системы двухфазных разделенных биореакторов (Daugulis et al., 2011; Gao et al., 2009; Nielsen et al., 2009), способ периодической подпитки субстратом (Kim et al., 2007) и белковая инженерия (Chen et al., 2014; Shang et al., 2020), большинство этих решений ограничены системами, где ингибирование задано исходным субстратом, и являются сложными для применения в контексте микробной инженерии для химического производства.

С использованием жиорообразующих дрожжей *Yarrowia lipolytica* для сверхпродукции каротеноидов, продемонстрированы два независимых способа, которые почти полностью обходят ингибирование субстратом. Сначала фермент ликопинциклаза был идентифицирован в качестве лимитирующего фактора в синтезе каротеноидов из-за его сильного ингибирования субстратом ликопином. Это приводило в результате не только к низким титрам β -каротина, но также к большим количествам сопутствующего ликопина в качестве побочного продукта. В свете этого, первым способом являлось использование направляемого структурой дизайна, в сочетании с филогенетической информацией, для получения вариантов белка с уменьшенным ингибированием. Из 50 полученных вариантов, идентифицирована одиночная мутация Y27R, которая полностью прекращала ингибирование субстратом без уменьшения активности фермента, приводя к заметному увеличению продукции β -каротина и 98% избирательность (% продукта против суммы всех каротеноидов). Альтернативно, во втором способе, сходные титры и избирательность для β -каротина получали посредством уменьшения потока углерода через каротеноидный путь и таким образом, предотвращения накопления ингибирующего метаболита до ингибирующих уровней, в отличие от традиционных парадигм инженерии пути. Этого достигали посредством разработки опосредованного геранилгеранилпирофосфатсинтазой (GGPPS) ограничителя метаболического потока, регулирующего скорость образования субстрата ликопина, таким образом, эффективно ослабляющего ингибирование субстратом. В то время как этот способ уменьшал поток через представляющий интерес путь, прирост благодаря супрессии уровней субстрата и таким образом, поддержанию высокой ферментативной активности, с избытком компенсировал любые потери продуктивности, страдающей от отклонения потока. С использованием способов, описанных выше, совместно с продуманным разделением клеточных ресурсов, предназначенных для синтеза против хранения каротеноидов, штамм, способный к продукции 39,5 г/л β -каротина (98% избирательность) с объемной продуктивностью 0,165 г/л/час при ферментациях в биореакторе, был, в конечном счете, разработан. Кроме того, посредством преднамеренного использования эффекта ингибирования субстратом, профиль продуктов сдвигали вместо этого к ликопину, достигая титров ликопина 17,6 г/л и продуктивности 0,073 г/л/час.

Ингибирование субстратом ликопинациклазы ограничивает синтез каротеноидов

Синтез β -каротина в *Y. lipolytica* требует гетерологичной экспрессии трех генов, кодирующих ферменты фитоенсинтазу, фитоендегидрогеназу и ликопинциклазу (**ФИГ. 16А** и **ФИГ. 22**). Кроме того, геранилгеранилдифосфатсинтазу (GGPPS) также следует учитывать, поскольку она контролирует поток, направленный к синтезу каротеноида вместо стерола (**ФИГ. 16А** и **ФИГ. 22**). Соответствующие гены получали, в качестве источников, из эукариотических организмов, *Xanthophyllomyces dendrorhous* и *Mucor circinelloides*, для экспрессии. Поскольку *Y. lipolytica* уже несет нативную копию GGPPS, являлось первой стадией введение экспрессирующих каскадов генов, кодирующих фитоендегидрогеназу и бифункциональную фитоенсинтазу/ликопинциклазу из *X. dendrorhous* (CrtI и CrtYB, соответственно) (Verdoes et al., 1999; Verdoes, Krubasik et al., 1999), или из *M. circinelloides* (CarB и CarRP, соответственно) (Velayos, Blasco et al., 2000; Velayos, Eslava et al., 2000), в штамм *Y. lipolytica* polf с использованием нарушения TRP1 (polf-T) (**ФИГ. 23** и **таблица 6**). Штамм YLMA02, экспрессирующий ферменты из *M. circinelloides*, продуцировал в 4,12 раз больше β -каротина (27,4 мг/л), чем штамм YLMA01, экспрессирующий ферменты из *X. dendrorhous* (**ФИГ. 16В**). Таким образом, пару CarB/CarRP использовали во всех следующих исследованиях.

Хотя синтез β -каротина наблюдали в YLMA02, титры являлись очень низкими, побуждая авторов настоящего изобретения исследовать стадию GGPPS в качестве следующей мишени. Введение дополнительной копии GGPPS из *X. dendrorhous* (GGPPxd) в штамм YLMA02 значительно увеличивало титры β -каротина до 0,48 г/л (**ФИГ. 16С**). Однако, это сопровождалось также большим увеличением накопления ликопина (**ФИГ. 16С**), что позволяло предполагать, что циклизация от ликопина до β -каротина являлась лимитирующим фактором пути. Соответственно, экспрессию ликопинациклазы увеличивали посредством увеличения количества копий ее гена. Кроме того, поскольку активность циклазы придается доменом R бифункционального фермента CarRP (Velayos, Eslava et al., 2000), вводили также модифицированный вариант белка с его доменом R, либо делегированным, либо мутированным (**ФИГ. 24А**), таким образом, чтобы он служил в качестве специализированной циклазы. Ни одно из этих усилий не было успешным для улучшения титров β -каротина (**ФИГ. 24В**), несмотря на то, что наблюдали более высокий уровень мРНК (**ФИГ. 24С**). Затем проверяли эффект введения ликопинциклаз (EuCrtY, PaCrtY, PfCrtY и HpCrtY) из четырех других организмов (**таблица 6**), которое приводило к умеренным улучшениям продукции β -каротина (**ФИГ. 24D**). Однако, проблема накопления ликопина оставалась в большой степени неустранимой, что позволяет предполагать, что сверхэкспрессия ликопинациклазы, независимо от ее источника, не являлась эффективным способом. Являлось очень возможным, что уровень белка ликопинациклазы не являлся ограничением в этом исследовании.

Поскольку ликопин являлся единственным агрегирующим предшественником (**ФИГ. 25**), и добавление дополнительных копий различных ликопинциклаз не обходило проблему, выдвинули гипотезу, что активность ликопинациклазы была ингибирована

посредством избытка ликопина через ингибирование субстратом (ФИГ. 16А). Для тестирования этой гипотезы, возможные корреляции между активностью ликопинциклазы и концентрацией ликопина исследовали с использованием ферментного анализа *in vitro*, в котором использовали микросомальную систему дрожжей, поскольку прогнозировано, что CarRP является мембранным белком с шестью трансмембранными спиралями (ФИГ. 26). Результаты показали, что активность ликопинциклазы являлась двухфазной в отношении концентрации ликопина: ферментативная активность первоначально увеличивалась с концентрацией ликопина, затем уменьшалась, когда ликопин достигал более высоких концентраций (ФИГ. 16D). Это поддерживало гипотезу, что ликопинциклаза была ингибирована субстратом, таким образом, образуя главный лимитирующий фактор в биосинтезе каротеноидов.

Направляемая структурой белковая инженерия полностью удаляет ингибирование субстратом

Затем оценивали удаление эффекта ингибирования субстратом ликопинациклазы посредством белковой инженерии. Поскольку ее кристаллическая структура являлась недоступной, платформу Transform-restrained Rosetta (TrRosetta) (Yang et al., 2020) использовали для получения вычислительной модели домена R (ликопинциклазы) CarRP (ФИГ. 27). Эволюционную информацию использовали посредством получения позиционно-специфичной матрицы замен (PSSM) из выравнивания множества последовательностей для идентификации положений, которые можно подвергать мутагенезу, для деконволюции областей фермента, которые вносили вклад в ингибирование субстратом. Одиночные и двойные аминокислотные замены получали на основе информации PSSM и кластеризовали для обеспечения максимального распространения протестированных вариантов (ФИГ. 28). Варианты кластеризовали с использованием PAM30 для вычисления расстояний между последовательностями и агрегативной кластеризации для подразделения последовательностей, максимизируя информацию, полученную в ходе первоначального скрининга. Посредством этого способа, получили набор из 50 кандидатов с мутациями, распространенными на протяжении фермента (ФИГ. 17А). Избирательность для β-каротина получали для каждого из вариантов (ФИГ. 17В). Среди них, для 3 вариантов, Y27R, V175W и T31R-F92W, показана значимо увеличенная избирательность для β-каротина, так же как улучшенные показатели продукции (ФИГ. 17В-17С) без влияния на экспрессию гена (ФИГ. 29), что позволяет предполагать ослабление эффекта ингибирования субстратом. Замены во всех трех вариантах были локализованы в специфической части фермента (ФИГ. 30), где для Y27R была наиболее выражена потеря ингибирования. Для варианта Y27R показана полная потеря ингибирования субстратом без уменьшения активности фермента (ФИГ. 16D), и получен титр 2,38 г/л β-каротина (ФИГ. 17С), вместе с избирательностью 98% (по сравнению с 18% для дикого типа, ФИГ. 17D).

Затем исследовали, являлся ли способным путь β-каротина, содержащий вариант Y27R, сохранять свои свойства минимального ингибирования субстратом в присутствии

значительно более высоких скоростей образования предшественника/субстрата. С этой целью, четыре ключевых фермента сверхэкспрессировали, tHMGR, ERG12, IDI и ERG20, из пути мевалоната (MVA) (Ro et al., 2006; Westfall et al., 2012) (**ФИГ. 22**) в продуцирующем β -каротин штамме YLMA11, экспрессирующем Y27R (**ФИГ. 17E**). Это приводило в результате к увеличенному титру 3,43 г/л β -каротина, с сохранением в то же время высокой избирательности 97,8%. Кроме того, синтетический путь утилизации изопентенола (IUP) (Chatzivasileiou et al., 2019; Clomburg et al., 2019; Rico et al., 2019; Lund et al., 2019) вводили посредством экспрессии холинкиназы (СК) и изопентенилфосфаткиназы (IPK) (**ФИГ. 22**), получая в результате дополнительное 23% увеличение продукции β -каротина (4,22 г/л), без какой-либо потери избирательности (YLMA15, **ФИГ. 17E**). Эти результаты показывают, что воспроизведенный путь без ингибирования субстратом функционирует эффективно в штаммах с высоким потоком изопреноидов, не подвергаясь влиянию внутриклеточных уровней предшественников/субстратов в клетках.

Управление ингибированием субстратом ликопинациклазы посредством опосредованного GGPPS ограничителя притока потока

Исследовали также другие осуществимые варианты, которые могут прекращать ингибирование субстратом без необходимости модификации ликопинациклазы. Выдвинули гипотезу, что ослабление скорости образования ликопина, относительно скорости его превращения, может, потенциально, снижать внутриклеточную концентрацию ликопина ниже ингибирующего уровня. Однако, это необходимо хорошо настраивать для предотвращения общего уменьшения скорости продукции конечного продукта посредством слишком большого ослабления образования ликопина. С этой целью, точку ветвления в узле FPP использовали для получения ограничителя метаболического потока и регуляции потока в направлении ликопина, таким образом, чтобы поддерживать субингибирующие уровни, но все еще высокое превращение ликопина в β -каротин (**ФИГ. 18A**). Таким образом, проводили поиск мутантов GGPPS с изменчивой активностью посредством скрининга пяти различных ферментов (**таблица 6**) с отличающейся каталитической эффективностью, измеренной посредством их скоростей синтеза GGPP *in vivo* (**ФИГ. 18B**). Относительно GGPPxd, для других четырех GGPPS показана более низкая продуктивность (**ФИГ. 18B**), которая должна переходить в более низкий поток синтеза ликопина. При введении этих GGPPS с более низкой активностью в штамм YLMA02 (базовый штамм, несущий CarRP дикого типа), уровни ликопина уменьшались (**ФИГ. 18C**), и продукция β -каротина увеличивалась, достигая вплоть до 1,26 г/л с 92,5% избирательностью, когда использовали GGPPsa из *Sulfolobus acidocaldarius* (**ФИГ. 18C**). Это дополнительно подтверждали посредством зависимостей от времени концентраций ликопина и β -каротина (**ФИГ. 18D**). Интересно, что, хотя экспрессия ослабленного GGPPsa (YLMA25) немного снижала поток, настроенный на синтез каротеноидов, это обходило любое ингибирование субстратом и обеспечивало возможность общего сбалансированного пути, который направляет весь поток углерода на образование β -

каротина, позволяя поведение пути, сходное с вариантом с Y27R (YLMA11, **ФИГ. 18D**). В отличие от этого, штамм YLMA03, экспрессирующий очень эффективный GGPPxd, обеспечивал наработку ликопина со слишком быстрой скоростью, запуская ингибирование субстратом и предотвращая его превращение в β -каротин (**ФИГ. 18D**). Эти результаты показывают, что ингибирование субстратом можно эффективно ослаблять посредством опосредованного GGPPS ограничителя метаболического потока для регуляции потока как выше, так и ниже ликопина, для его оптимального превращения в β -каротин.

Для закрытия пробела в продукции β -каротина между двумя способами инженерии, ослабляющими ингибирование субстратом (**ФИГ. 17C** и **ФИГ. 18C**), путь с поддержкой посредством опосредованного GGPPS ограничителя притока потока сверхэкспрессировали посредством вставки дополнительных копий (**ФИГ. 18E**). Эта модуляция не только усиливала биосинтез β -каротина вплоть до 2,13 г/л, но также далее максимизировала его избирательность (от 92,1% до 98,1%, **ФИГ. 18E**). Кроме того, подобно предшествующим результатам, сверхэкспрессия MVA и IUP способствовали продукции β -каротина вплоть до 3,72 г/л без влияния на избирательность (**ФИГ. 18F**). Это дополнительно подчеркивало тот факт, что путь мог функционировать с высокой эффективностью, как только проблема ингибирования субстратом была устранена.

Профиль продуктов β -каротина против ликопина можно сдвигать посредством изменения активности GGPPS *in vivo* (**ФИГ. 18B-18C**). Можно также получать преимущество от высокой активности GGPPxd для воспроизведения специализированного продуцирующего ликопин штамма. При комбинировании этой идеи с вариантом CarRP (E78K) (Velayos, Eslava, et al., 2000) (**ФИГ. 32A-32B**), успешно продуцировали 2,62 г/л ликопина с не поддающимися детекции количествами β -каротина (**ФИГ. 18G**). Дополнительного увеличения продукции ликопина достигали посредством сверхэкспрессии пути MVA и введения IUP, достигая титров 3,09 г/л (YLMA34, **ФИГ. 33**).

Разделение потока углерода между синтезом изопреноидов и липидов для усиления внутриклеточного накопления каротеноидов

Липидные тельца в *Y. lipolytica* образуют гидрофобные карманы, которые способствуют секвестрации и хранению липофильного изопреноидного продукта (Qiao et al., 2017). Однако, в то время как увеличенное снабжение триацилглицерином (TAG) может усиливать хранение изопреноидов (Ma et al., 2019; Larroude et al., 2018), это возникает за счет ацетил-СоА, общего предшественника для синтеза изопреноидов и липидов (**ФИГ. 19A**). Таким образом, поток углерода необходимо оптимально разделять между синтезом липидов и изопреноидов, с целью обеспечения достаточного снабжения липидами для инкапсуляции продуцированных изопреноидов, в то же время не уводя слишком много ацетил-СоА от пути MVA. С этой целью, принято решение культивировать продуцирующий β -каротин штамм YLMA15 в средах с изменяющимися соотношениями углерода-к-азоту (C/N) (**ФИГ. 34**), поскольку способность к образованию липидов можно легко контролировать посредством соотношения C/N культуральных сред (Braunwald et al., 2013; Somashekar et al., 2000). Исходную концентрацию глюкозы для всех условий

фиксируют на 50 г/л, что, как определили, являлось оптимумом для штаммов (ФИГ. 35). Обнаружили, что с увеличением соотношений C/N, содержание липидов в клетках увеличивалось монотонно (ФИГ. 19B), в то время как общая биомасса уменьшалась (из-за уменьшенной доступности азота, ФИГ. 36). Однако, получили оптимальное условие для продукции β-каротина в отношении как титра (7,5 г/л, ФИГ. 19C), так и клеточного содержания (360,8 мг/г DCW, ФИГ. 19D), посредством использования сред Y₁₀P₁₀D₅₀ (10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л пептона и 50 г/л глюкозы) с соотношением C/N 9:1. Отклонения от этого оптимума приводили к уменьшению уровней β-каротина, что согласовывалось с гипотезой и подчеркивало важность установления оптимального баланса биосинтеза каротеноидов и липидов. Оптимальные среды Y₁₀P₁₀D₅₀ использовали также для продуцирующего ликопин штамма (YLMA34), где концентрацию 8,02 г/л ликопина получали после 5-суточной ферментации (ФИГ. 37).

Биосинтез каротеноидов во время стационарной фазы с истощением глюкозы поддерживается посредством деградации клеточных липидов

В экспериментах ферментации с использованием штамма YLMA15, описанного в настоящем описании, обнаружено, что содержание β-каротина продолжало расти в ходе стационарной фазы, даже после того, как глюкоза в средах была истощена (ФИГ. 20A). Вероятно, что *Y. lipolytica* мобилизовал предварительно сохраненные TAG в качестве альтернативного источника углерода для поддержания образования каротеноидов (Wang et al., 2020). Для тестирования этой гипотезы, принято решение характеризовать клетки вместе с их внутриклеточными липидами как до, так и после истощения глюкозы. На протяжении процесса ферментации, содержание липидов первоначально увеличивалось, достигая максимума на сутки 3, после чего оно быстро уменьшалось, когда глюкоза была полностью израсходована (ФИГ. 20A). В то же время, несмотря на уменьшение содержания липидов, содержание β-каротина продолжало расти далеко за точкой истощения глюкозы (ФИГ. 20A), что позволяет предполагать, что TAG были использованы для поддержания метаболической активности и синтеза каротеноидов. Микроскопическая визуализация изменений, возникающих в ходе ферментации, являлась согласованной с этой гипотезой. Когда глюкоза все еще присутствовала во время исходных 3 суток, липидные капли внутри клеток постепенно агломерировали в липидные тельца, которые секвестрировали продуцированный β-каротин (ФИГ. 38). Однако, являлось также очевидным, что липидные тельца больше не были видимыми во время более поздних стадий ферментации из-за разрушения TAG, которое, в свою очередь, вынуждало накопленный β-каротин становиться более диспергированным по клетке (ФИГ. 38).

Поскольку деградация TAG возникает в первую очередь посредством β-окисления для образования ацетил-CoA (Xu et al., 2016) (ФИГ. 19A), является вероятным, что это обеспечивает карбоновый остов для синтеза β-каротина во время стационарной фазы с истощением глюкозы. Для тестирования этой гипотезы, YLMA15 культивировали в средах YNB с единообразно меченной [U-¹³C₆]глюкозой и природным содержанием стеариновой

кислоты. После добавления стеариновой кислоты, которая подвергается катаболизму посредством β -окисления, наблюдали большие фракции немеченых IPP/DMAPP и GGPP, главных предшественников для синтеза β -каротина, в пределах 24 час культивирования (ФИГ. 20В-20С). Эти результаты позволяют предполагать, что ацетил-СоА, образованный посредством β -окисления, действительно может поддерживать путь MVA и, в конечном счете, вносить вклад в образование β -каротина. Таким образом, это, вероятно, является механизмом, используемым клетками для превращения TAG в каротеноиды во время стационарной фазы с истощением глюкозы.

Исследования культивирования в биореакторе

Наконец, оценивали производительность сконструированных штаммов, с ослабленным ингибированием субстратом в 3 л культивированиях с подпиткой. После оптимизаций биореактора, для штамма YLMA15 достигали общего титра β -каротина и содержания 39,5 г/л и 494 мг/г DCW, соответственно, с продуктивностью 0,165 г/л/час (ФИГ. 21А-21С). Подобным образом, при ферментации в биореакторе продуцирующего ликопин штамма YLMA34 получали 17,6 г/л ликопина (313 мг/г DCW) с продуктивностью 0,073 г/л/час (ФИГ. 21D-21F). Примечательно, не наблюдали изменений избирательности для β -каротина в штамме YLMA15 в ходе увеличения масштаба процесса (98% в биореакторе с периодической подпиткой, по сравнению с 97,9% в встряхиваемых колбах (ФИГ. 39)). Эти фигуры показывают надежность способа инженерии и ферментации при высокой плотности клеток, с показателями продукции, превышающими предшествующие результаты (обобщение опубликованной продукции каротеноидов представлено в **таблице 8**).

Настоящее изобретение относится к демонстрации того, что ликопинциклаза противодействует продукции β -каротина посредством ингибирования субстратом, регуляторного эффекта, менее опубликованного в контексте микробного синтеза. Ингибирование субстратом ферментов можно преодолевать посредством модификации структуры белка, способа, который успешно применяли для множества ферментов (Shang et al., 2020). Однако, эти усилия основаны на легко доступных кристаллических структурах белка, что не является случаем для ликопинциклазы, исследованной в настоящем описании. Хотя направленная эволюция является мощным способом адаптации ферментов к специфическим задачам (Reetz et al, 2013), она часто требует высокопроизводительных способов детекции для скрининга больших библиотек. Кроме того, из-за отсутствия информации о кристаллической структуре, эффективный направляемый структурой дизайн в значительной степени основан как на качестве вычислительного моделирования, так и на точности докинга субстрата в его участке связывания. В настоящее время, комбинирование структурной и филогенетической информации, уточнило поиск и позволило авторам настоящего изобретения выделить многообещающий мутант посредством скрининга только 50 вариантов, где для 3 из вариантов показано уменьшение или удаление ингибирования субстратом. Кроме того, информацию о ключевых аминокислотах можно несколько раз передавать обратно в

вычислительную модель для дальнейшей оптимизации свойств ферментов. Механистическое понимание того, какой фактор вызывал удаление ингибирования субстратом, может требовать более тщательного исследования, лежащего за пределами объема этого исследования. Небольшое количество вариантов белка, сконструированных и протестированных, позволяет предполагать, что направляемый структурой способ, в сочетании с филогенетической информацией, предлагает эффективный способ для белковой инженерии.

Степень ингибирования субстратом можно также контролировать посредством настраивания относительных скоростей вышестоящих и нижестоящих путей, образующих и потребляющих ингибирующий субстрат. В случае синтеза β -каротина, выбор вариантов GGPPS с более низкой активностью уменьшал поток через каротеноидный путь. В то же время, полученное прекращение ингибирования субстратом позволяло отклонение всего потока каротеноидов в направлении синтеза β -каротина, в отличие от комбинации как ликопина, так и β -каротина. Это приводило к увеличению продукции β -каротина с высокой специфичностью (>98%), несмотря на более низкую активность GGPPS. С другой стороны, ингибирование субстратом можно также преднамеренно использовать, если ликопин является желательным продуктом. В этом случае, высокоэффективный GGPPS может вынуждать образование ликопина опережать его истощение, приводя к его накоплению, которое затем далее умножает дисбаланс посредством ингибирования субстратом. Соответственно, профиль продуктов очень сильно сдвигается от богатого β -каротином до богатого ликопином. Эти обнаружения иллюстрируют, что конструирование проксимальных ферментов может оказывать глубокие эффекты на динамику пути, предоставляя новую парадигму для контроля метаболизма.

Другим важным соображением в метаболической инженерии является то, как гетерологичные пути взаимодействуют с нативными путями. Конструирование путей, которые являются ортогональными или оказывают минимальное влияние на нативные функции организма, являлось точкой фокусировки для многих усилий для конструирования штаммов (Ro et al., 2006; Tan et al., 2016; Zhao et al., 2018; Brockman et al., 2015). Хорошо известно, что липофильный характер каротеноидов способствует их хранению в липидных тельцах клеток. В Larroude et al. (Larroude et al., 2018) обнаружено, что сконструированный штамм - сверхпродуцент липидов являлся способным к продукции большего количества β -каротина с титром 6,5 г/л, в то же время сопровождающейся продукцией 42,6 г/л липидов. Предоставляя в то же время совместимые компартменты для накопления гидрофобных изопреноидов, образование TAG заново также потребляет большое количество источника углерода, что приводит к ограниченному потоку ацетил-CoA в MVA и образующий продукт путь. В этом исследовании было показано, что нативная способность *Y. Lipolytica* к накоплению TAG являлась достаточной для секвестрации каротеноидов. Посредством установления баланса распределения потока между синтезом каротеноидов и липидов посредством коррекций

соотношения C/N, более крупную часть пула ацетил-СоА сохраняли для продукции каротеноидов, достигая высоких титров и содержания на клетку.

Пример 6. Материалы и способы, относящиеся к примеру 5

Условия культивирования и среды

Клетки *Escherichia coli* DH5 α выращивали в средах Лурия-Бертани (LB) (BD bioscience) при 37°C с постоянным встряхиванием. Соответствующие антибиотики (100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина) добавляли для отбора плазмид. Все штаммы *Yarrowia lipolytica* культивировали при 30°C с встряхиванием при 230 об./мин. Для *Y. lipolytica*, использовали среды YPD, состоящие из 10 г/л дрожжевого экстракта (BD bioscience), 20 г/л пептона (BD bioscience) и 20 г/л глюкозы (Sigma-Aldrich). Кроме того, среды YNB, состоящие из 1,7 г/л базовой азотной среды для дрожжей (YNB, VWR Life Science), 20 г/л глюкозы, 5 г/л сульфата аммония (VWR Life Science), 15 г/л агара (BD bioscience) и 0,77 г/л подходящей полной смеси добавок без урацила, лейцина или триптофана (Sunrise science products), использовали для отбора трансформированных штаммов *Y. lipolytica*.

Конструирование плазмид и штаммов

E. coli DH5 α использовали для клонирования и размножения плазмид. Штамм *Y. lipolytica* *rolf* служил в качестве базового штамма, и все производные и плазмиды, сконструированные в настоящем исследовании, перечислены в **таблице 7**. Праймеры, используемые для конструирования плазмид, показаны в **таблице 9**. Все рестрикционные ферменты были закуплены из New England Biolabs (NEB). Амплификацию ПЦР проводили с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (NEB) или ДНК-полимеразы GoTaq (Promega). Фрагменты после ПЦР очищали с использованием набора для выделения фрагментов ZYMO (ZYMO research). Затем плазмиды конструировали из очищенных фрагментов после ПЦР с использованием набора для сборки по Гибсону Gibson Assembly kit (NEB), трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* посредством теплового шока, и выделяли с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Все способы осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Все сконструированные штаммы *Y. lipolytica* конструировали посредством трансформации линейаризованными плазмидами (расщепление Not1) с использованием литий-ацетатного способа. Рекомбинанты подтверждали посредством амплификации ПЦР из геномной ДНК. Гены биосинтеза каротеноидов, оцениваемые в этом исследовании, все были оптимизированы по кодонному составу для *Y. lipolytica*.

*Нарушение TRP1 в штамме *rolf* с использованием CRISPR-Cas9*

Для нарушения *TRP1*, плазмидой CRISPR-Cas9 (Schwartz et al., 2016), содержащей гРНК (ACGCCGAGGAGTGGTACCGG) (SEQ ID NO: 30), нацеленную на ген *TRP1* (YALI0B07667g) *Y. lipolytica*, трансформировали штамм *rolf* с использованием *Ura3* в качестве ауксотрофного маркера. Штамм с ауксотрофностью по триптофану получали посредством отбора на чашках с YNB-Ura и YNB-Ura-Trp. После этого, положительными

клонами инокулировали чашки с YPD и субкультивировали три раза для потери плазмиды CRISPR-Cas9, поучая в результате штамм polf-T (*ura3⁻, leu2⁻, trp1⁻*).

Избавление от ауксотрофных маркеров посредством системы Cre-loxP

Плазмидой pYLMA-Cre трансформировали целевые штаммы *Y. lipolytica* для удаления маркеров *URA3*, *LEU2* и *TRP1*. Трансформанты отбирали на чашке с агаром с YPD, дополненной конечной концентрацией 250 мг/л гигромицина В (Sigma-Aldrich). После 2~3 суток культивирования, колонии переносили на новую чашку с YPD, содержащую гигромицин В, еще на 1 сутки, чтобы позволить более успешные делеции маркеров. Удаление маркеров подтверждали посредством субкультивирования колоний на чашках с агаром с YNB-Ura, YNB-Leu и YNB-Trp, соответственно. Успешное удаление всех трех маркеров приводило к фенотипу, придающему недостаточность урацила, лейцина и триптофана. Затем плазмиду pYLMA-Cre в клетках удаляли посредством инкубации положительных штаммов на чашках с агаром с YPD при 30°C в течение 24 час, с 2~3 повторами.

Ферментации в встряхиваемых колбах

Отдельные колонии рекомбинантных штаммов отбирали с чашки, инокулировали в 2 мл сред YPD и культивировали в течение ночи (16~18 час) при 30°C и 230 об./мин. Затем культуру переносили в 50 мл встряхиваемую колбу, содержащую 10 мл сред YPD (исходная OD₆₀₀=0,1), и культивировали при 30°C с встряхиванием при 230 об./мин в течение 3~5 суток. Когда это применимо, 30 мМ изопренол (Sigma-Aldrich) добавляли в среды YPD, когда глюкоза в культуре была почти потреблена.

Ферментации в биореакторах

Периодические ферментации с подпиткой проводили в 3 л биореакторе (система New Brunswick Bioflo115). Начальную ферментацию проводили с использованием 1 л среды, содержащей 100 г/л глюкозы, 100 г/л пептона и 50 г/л дрожжевого экстракта. Температуру поддерживали при 30°C. Растворенный кислород контролировали при 20% с использованием каскада встряхивания при 250~800 об./мин. Воздух барботировали в ферментер при 2 об./об./мин. pH поддерживали при 6,8 посредством подпитки 5 М NaOH или 5 М HCl. Пенообразование предотвращали посредством добавления противовспенивающего средства 204 (Sigma-Aldrich). Периодический процесс с подпиткой начинали после 48 час часов культивирования с 10 x Y₁₀P₁₀D₅₀ средами, состоящими из 100 г/л дрожжевого экстракта, 100 г/л пептона и 500 г/л глюкозы. После начала подпитки средами, встряхивание и аэрацию изменяли и поддерживали постоянно при 600 об./мин и 0,3 об./об./мин, соответственно. Образцы отбирали каждые 24 час для измерения OD₆₀₀, концентрации глюкозы и титра каротеноидов.

Количественная оценка остаточной глюкозы в средах

500 мкл образца извлекали из культуры для количественной оценки остаточной глюкозы. Клетки центрифугировали при 12000 об./мин в течение 5 мин, и затем супернатант фильтровали через 0,2 мкм шприцевые фильтры до инъекции в устройство для высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent technologies 1260 (HPLC),

оборудованное детектором показателя преломления. Колонку Bio-Rad HPX-87H использовали для разделения с использованием 14 мМ серной кислоты в качестве подвижной фазы, протекающей со скоростью 0,7 мл/мин. Объем инъекции составлял 10 мкл. Температура колонки составляла 50°C.

Экстракция и количественная оценка липидов

Жирные кислоты, синтезированные посредством *Y. lipolytica*, включая пальмитат (C16:0), пальмитолеат (C16:1), стеарат (C18:0), олеат (C18:1) и линолеат (C18:2), количественно оценивали с использованием газовой хроматографии в сочетании с детектором ионизации в пламени (GC-FID). 0,1~1 мл культуры клеток извлекали из каждого биореактора, так чтобы образец содержал приблизительно 1 мг биомассы. Проводили стадию центрифугирования при 16000 g в течение 10 мин, и супернатант отбрасывали. 0,5 мл раствора 0,5 М гидроксида натрия-метанола (20 г/л гидроксида натрия в безводном метаноле) смешивали с осадками клеток, с последующим добавлением 100 мкл внутренних стандартов, содержащих 2 мг/мл метилтридеcanoата (Sigma-Aldrich) и 2 мг/мл глицерилтригептадеcanoата (Sigma-Aldrich), растворенных в гексане. Метилтридеcanoат использовали для коррекции потери объема в ходе подготовки образца, и глицерилтригептадеcanoат использовали для коррекции эффективности трансэстерификации. Образцы встряхивали в течение 1 час, чтобы позволить трансэстерификацию липидов до метиловых сложных эфиров жирных кислот (FAME). Затем 40 мкл 98% серной кислоты (Sigma-Aldrich) добавляли для нейтрализации pH. Затем FAME экстрагировали посредством добавления 0,5 мл гексана, с последующим встряхиванием в течение 30 мин. Затем проводили центрифугирование при 12000 g в течение 1 мин для удаления клеточного дебриса, и верхний гексановый слой экстрагировали для анализа. Разделение видов FAME осуществляли на капиллярной колонке Agilent HP-INNOWax. Объем инъекции составлял 1 мкл, отношение деления потока составляло 10, и температура инъекции составляла 260°C. Колонку поддерживали при постоянной температуре 200°C, и гелий использовали в качестве газа-носителя со скоростью потока 1,5 мл/мин. FID устанавливали на температуру 260°C со скоростями потока подпиточного газа гелия, водорода и воздуха 25 мл/мин, 30 мл/мин и 300 мл/мин, соответственно.

Экстракция и количественная оценка внутриклеточных метаболитов

Для экстракции внутриклеточных метаболитов (например, IPP/DMAPP и GGPP), 1 мл культуры фильтровали через 25-мм 0,2 мкм нейлоновый фильтр с использованием вакуумной фильтрации. Клетки немедленно промывали с использованием 2 мл воды, предварительно нагретой до 30°C, и фильтр погружали в ледяной буфер для экстракции (40% метанол+40% ацетонитрил+20% вода). После инкубации при -20°C в течение 20 мин, раствор экстракта центрифугировали при 16000 об./мин в течение 10 мин, и супернатант переносили в новую пробирку и высушивали. Образец ресуспендировали с использованием 50 мкл воды, и затем центрифугировали при 16000 об./мин в течение 10 мин. Метаболиты в супернатанте количественно оценивали посредством жидкостной

хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS), состоящей из системы для LC Agilent серий 1100 и AB Sciex API-4000 MS. 10 мкл образец инъецировали и разделение осуществляли на колонке Waters XBridge C-18 с подвижной фазой, состоящей из раствора А (0,1% трибутиламина, 0,12% уксусной кислоты, 0,5% 5М NH₄OH в воде, об./об.) и раствора В (100% ацетонитрила). Скорость потока составляла 0,3 мл/мин, и использовали следующие градиенты: 0-5 мин, 0% В; 5-20 мин, 0~65% В; 20-25 мин, 65% В; 25-30 мин, 100% В; 30-35 мин, 100% В; 35-36 мин 100~0% В, 0% В до 45 мин. Затем аналиты сравнивали со стандартными кривыми, полученными с использованием химических стандартов, закупленных из Sigma-Aldrich и Cayman Chemicals.

Эксперименты мечения

Штаммы, используемые в исследованиях мечения, приводили в жизнеспособное состояние в средах YNB с [U-¹³C]глюкозой в качестве единственного источника углерода. Затем их субкультивировали в таких же средах и выращивали до ранней стационарной фазы при 30°C. Образцы отбирали до начала импульсного добавления дополнительного источника углерода с использованием такого же способа экстракции межклеточных метаболитов. Затем 10 мМ стеариновую кислоту добавляли к соответствующим культурам, и измерения изотопного обогащения метаболитов получали в различных временных точках. Оптические плотности, ассоциированные с каждым образцом, также регистрировали. IPP/DMAPP и GGPP количественно оценивали посредством LC-MS/MS, как указано ранее. Все данные MS из экспериментов мечения корректировали на природное содержание с использованием IsoCor (Millard et al., 2012).

Экстракция каротеноидов

Экстракцию каротеноидов проводили, как описано (Asker et al., 2017) со следующей модификацией. Кратко, 100 мкл культуры центрифугировали в течение 1 мин при 16000 g, и осадки клеток суспендировали в 900 мкл диметилсульфоксида (DMSO, Sigma-Aldrich) перед нагревом до 50°C в течение 1 час, пока клетки не обесцвечивались, в водяной бане. Экстракты DMSO быстро смешивали с 450 мкл метанола и центрифугировали при 16000 g в течение 5 мин. Полученные супернатанты переносили в 96-луночные планшеты для анализа или стеклянные флаконы для анализа и количественной оценки каротеноидов.

Анализ и количественная оценка каротеноидов

Продукцию каротеноидов выражали как грамм на литр ферментационного бульона (г/л) и миллиграмм на грамм сухой массы клеток (мг/г DCW). Оптические плотности измеряли при 600 нм с использованием Thermo Spectronic Genesys 20 (Thermo Scientific) и использовали для расчета массы клеток ($DCW=0,35 \times OD_{600}$ для β -каротина и $DCW=0,30 \times OD_{600}$ для ликопина, **ФИГ.40А-40В**). Анализ и количественную оценку β -каротина проводили посредством устройства для HPLC (SHIMADZU LC-20 AT), оборудованного колонкой Kromasil C18 (4,6 мм x 250 мм) и детекцией в УФ/видимой области спектра при 450 нм. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила-метанола-изопропанола (5:3:2 об./об.) со скоростью потока 1 мл/мин при 40°C. Анализ и

количественную оценку ликопина проводили с использованием считывателя для микропланшетов Spectramax M2e (Molecular devices) или HPLC при 470 нм. Стандартные кривые β -каротина и ликопина (Sigma-Aldrich) получали посредством осуществления такого же способа экстракции, как для образцов.

Количественная ПЦР с детекцией в реальном времени

ПЦР с детекцией в реальном времени (RT-ПЦР) использовали для оценки относительной экспрессии гена. мРНК, экстрагированную посредством набора для очистки РНК дрожжей MasterPure™ Yeast RNA purification kit (Lucigen, Wisconsin, USA), использовали в качестве матрицы. RT-ПЦР проводили в iCycler (Bio-Rad, USA) с использованием набора для одностадийной RT-ПЦР iScript™ one-step RT-PCR kit со смесью SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA), в соответствии с инструкциями производителя. ACT1 использовали в качестве гена внутреннего контроля для нормализации. Относительную экспрессию гена рассчитывали с использованием сравнительного способа $2^{-\Delta\Delta CT}$ или $2^{-\Delta CT}$.

Ферментные анализы in vitro

Микросомы дрожжей для ферментативных анализов *in vitro* получали, как описано ранее (Rompon et al., 1996). Кратко, штаммы, несущие относящийся к дикому типу или мутантный CarRP, выращивали в течение ночи в средах YNB при 30°C и затем инокулировали в 200 мл сред YNB до исходной OD₆₀₀ 0,1. После 24 час культивирования, клетки собирали центрифугированием при 4000 об./мин в течение 10 мин. За этим следовало ресуспендирование клеток в буфере ТЕК (50 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 1 мМ ЭДТА, 0,1 М КСl), и раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем клетки выделяли посредством центрифугирования, промывали в буфере ТЕС (50 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 1 мМ ЭДТА, 0,6 М сорбит), ресуспендировали в буфере ТЕСМ (50 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 1 мМ ЭДТА, 0,6 М сорбит, 14 мМ 2-меркаптоэтанол) и оставляли при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем клетки выделяли еще раз посредством центрифугирования, промывали в буфере для экстракции (50 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF) и ресуспендировали в буфере для экстракции. Стеклообразные бусины добавляли в каждый образец, которые периодически встряхивали в течение 30 с и помещали на лед на 30 с, в течение всего 15 повторов. Затем осадки клеток отбрасывали посредством центрифугирования при 4000 об./мин, 4°C в течение 10 мин, и супернатант переносили в 50 мл пробирку. Неочищенную микросомальную фракцию дрожжей, собранную выше, использовали для анализов ликопинациклазы *in vitro*. Стандартные ферментные анализы проводили в общем объеме 200 мкл, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и 1 мг микросомальных белков. Серийные концентрации ликопина (50~350 мкмоль/л), разведенного в диметилсульфоксиде (DMSO), использовали в качестве субстрата. Реакции начинали посредством добавления субстрата, инкубации при 30°C с осторожным встряхиванием в течение 16 час, и затем останавливали посредством добавления 200 мкл этилацетата.

Раствор встряхивали в течение 10 мин, и органическую фазу собирали посредством центрифугирования и анализировали посредством HPLC.

Получение вариантов белка

Варианты получали посредством анализа консервативных аминокислот и коэволюционной информации о семействе этого белка из позиционно-специфичной матрицы замен (PSSM). В настоящее время матрицу получали с использованием psiblast из ncbi-blast-2.7.1+ (Altschul et al., 1997) с использованием uniref90 (Suzek et al., 2007) в качестве базы данных и значения E 0,01, проводя 3 повтора. Для всех положений в белке, балл PSSM, который представляет консервативность аминокислот, рассчитывали как для ликопинциклазы, так и для других гомологичных белков из этого семейства. Более высокий балл показывает более консервативную аминокислоту в этом положении. Проводили скрининг замен, которые можно заменять на более консервативные аминокислоты, на основании баллов PSSM. Рассчитывали значение различия между потенциальными заменами и аминокислотами дикого типа, и сортировали баллы. Все глициновые замены удаляли из сортировки. 25 замен с наивысшими баллами комбинировали в двойные замены случайным образом. Матрицу расстояний вычисляли с использованием матрицы замен PAM30 и кластеризовали с использованием Agglomerative в sklearn (Pedregosa et al., 2011) на 25 кластеров для минимизации количества для тестирования. Варианты выбирали случайным образом внутри каждого кластера. Ранжированные 26-50 оцененных замен располагали по порядку как варианты одиночных мутаций.

Модель гомологии ликопинациклазы

Модель гомологии получали для ликопинциклазы с использованием сервера TrRosetta (Yang et al., 2020), вводя последовательность домена R (аминокислоты 1-239) CarRP.

Расчет соотношения C/N в средах

Соотношение C/N рассчитывали со ссылкой на состав дрожжевого экстракта (Bacto™) и пептона (Bacto™) в техническом руководстве BD Bionutrients™ (таблица 10) (legacy.bd.com/ds/technicalCenter/misc/lcn01558-bionutrients-manual.pdf). Углерод в дрожжевом экстракте и пептоне игнорировали из-за его чрезвычайно более низкой концентрации, относительно концентрации глюкозы. Общий азот в дрожжевом экстракте и пептоне составляет 10,9% и 15,4%, соответственно. Соотношение C/N получали с использованием следующей формулы. X, Y и Z представляют собой концентрацию глюкозы, дрожжевого экстракта и пептона, соответственно.

$$\frac{\text{Углерод из глюкозы}}{\text{Азот из (дрожжевого экстракта + пептона)}} = \frac{\frac{X}{180,156 \text{ г моль}^{-1}} \times 6}{\frac{(10,9\% \times Y + 15,4\% \times Z)}{14 \text{ г моль}^{-1}}}$$

Таблица 6. Список гетерологичных ферментов, используемых в примере 5.

Фермент	Наименование, используемое в	Но. доступа	Организм
---------	------------------------------	-------------	----------

	ЭТОМ ИССЛЕДОВАНИИ		
Фитоендегидрогеназа	CrtI	AY177424.1	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>
	CarB	AJ238028.1	<i>Mucor circinelloides</i>
Фитоенсинтаза /ликопинциклаза	CrtYB	AY177204.1	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>
	CarRP	AJ250827.1	<i>Mucor circinelloides</i>
Синтаза GGPP	GGPPpa	AAA21260.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
	GGPPtc	AF081514.1	<i>Taxus canadensis</i>
	GGPPsa	D28748.1	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
	GGPPxd	DQ016502.1	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>
	GGPPyl	XM502923.1	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Бета-ликопинциклаза	EuCrtY	D90087.2	<i>Erwinia uredovora</i>
	PaCrtY	JX871358.1	<i>Pantoea agglomerans</i>
	PfCrtY	CP002727.1	<i>Pseudomonas fulva</i>
	HpCrtY	AY182008.1	<i>Haematococcus pluvialis</i>

Таблица 7. Штаммы и конструкции, используемые в примере 5.

Наименование штамма	Описание штаммов и плазмид	Источник
polf	<i>MataA, leu2-270, ura3-302, xpr2-322, axp-2</i>	Лабораторный препарат для хранения
polf-T	<i>MataA, leu2-270, ura3-302, xpr2-322, axp-2, trp1</i>	Пример 5
YLMA01	polf-T, <i>URA3:: T_{Lip1}-CrtI-P_{GPD}+P_{TEF}-CrtYB-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA02	polf-T, <i>URA3:: T_{Lip1}-CarB-P_{GPD}+P_{TEF}-CarRP-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA03	YLMA02, <i>LEU2:: P_{TEF}-GGPPxd-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA04	YLMA03, <i>TRP1:: P_{TEF}-CarRP-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA05	YLMA03, <i>TRP1:: P_{TEF}-tCarRP-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA06	YLMA03, <i>TRP1:: P_{TEF}-mCarRP-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA07	YLMA03, <i>TRP1:: P_{TEF}-EuCrtY-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA08	YLMA03, <i>TRP1:: P_{TEF}-PaCrtY-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA09	YLMA03, <i>TRP1:: P_{TEF}-PfCrtY-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA10	YLMA03, <i>TRP1:: P_{TEF}-HpCrtY-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA11	polf-T, <i>LEU2:: P_{TEF}-GGPPxd-T_{XPR2}+T_{Lip1}-CarB-P_{GPD}+P_{TEF}-CarRP^{Y27R}-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA12	polf-T, <i>LEU2:: P_{TEF}-GGPPxd-T_{XPR2}+T_{Lip1}-CarB-P_{GPD}+P_{TEF}-CarRP^{VI75W}-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA13	polf-T, <i>LEU2:: P_{TEF}-GGPPxd-T_{XPR2}+T_{Lip1}-CarB-P_{GPD}+P_{TEF}-CarRP^{T31R-F92W}-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA14	YLMA11, <i>URA3:: T_{Lip1}-ERG12-P_{EXP1}+P_{TEFin}-tHMGR-T_{XPR2}+ T_{Lip1}-ERG20-P_{EXP1}+P_{TEFin}-IDI-T_{XPR2}</i>	Пример 5
YLMA15	YLMA14, <i>TRP1:: T_{Lip1}-CK-P_{EXP1}+P_{TEFin}-IPK-T_{XPR2}</i>	Пример 5

YLMA16	polf-T, <i>TRP1</i> :: T _{Lip1} -CK-P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>IPK</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA17	polf, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPptc</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA18	polf, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPpa</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA19	polf, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPyl</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA20	polf, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPsa</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA21	polf, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPxd</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA22	YLMA02, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPptc</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA23	YLMA02, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPpa</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA24	YLMA02, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPyl</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA25	YLMA02, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPsa</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA26	polf-T, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPsa</i> -T _{XPR2} +T _{Lip1} - <i>CarB</i> -P _{GPD} +P _{TEF} - <i>CarRP</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA27	YLMA26, <i>TRP1</i> :: P _{TEF_{fin}} - <i>GGPPsa</i> -T _{XPR2} +T _{Lip1} - <i>CarB</i> -P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>CarRP</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA28	YLMA27, <i>URA3</i> :: P _{TEF_{fin}} - <i>GGPPsa</i> -T _{XPR2} +T _{Lip1} - <i>CarB</i> -P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>CarRP</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA29	YLMA28, <i>ura⁻leu⁻trp⁻</i>	Пример 5
YLMA30	YLMA29, <i>URA3</i> :: T _{Lip1} - <i>ERG12</i> -P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>tHMGR</i> -T _{XPR2} + T _{Lip1} - <i>ERG20</i> -P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>IDI</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA31	YLMA30, <i>TRP1</i> :: T _{Lip1} -CK-P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>IPK</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA32	polf-T, <i>LEU2</i> :: P _{TEF} - <i>GGPPxd</i> -T _{XPR2} +T _{Lip1} - <i>CarB</i> -P _{GPD} +P _{TEF} - <i>CarRP</i> ^{E78K} -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA33	YLMA32, <i>URA3</i> :: T _{Lip1} - <i>ERG12</i> -P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>tHMGR</i> -T _{XPR2} + T _{Lip1} - <i>ERG20</i> -P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>IDI</i> -T _{XPR2}	Пример 5
YLMA34	YLMA33, <i>TRP1</i> :: T _{Lip1} -CK-P _{EXP1} +P _{TEF_{fin}} - <i>IPK</i> -T _{XPR2}	Пример 5

Таблица 8. Обобщение продукции каротеноидов в микроорганизмах.

Каротеноиды	Хозяин	Масштаб ферментации	Титр (г/л)	Содержание (мг/г DCW)	Продуктивность (г/л/час) ^a	Ссылки
β-каротин	<i>Y. lipolytica</i>	3 л ферментер	39,5	494	0,165	Пример 5
		5 л ферментер	6,5	90	0,045	Li et al. 2016
		2 л ферментер	4	50	0,014	Liu et al., 2019
	<i>S. cerevisiae</i>	5 л ферментер	1,2	21	0,01	Wu et al. 2016
	<i>E. coli</i>	5 л ферментер	3,2	-	0,04	Keasling et al., 2010

		7 л ферментер	2,1	60	0,021	Reed et al., 2010
		5 л ферментер	2	-	0,015	Boutin et al., 2005
Ликопин	<i>Y. lipolytica</i>	3 л ферментер	17,6	313	0,073	Пример 5
		3 л ферментер	4,2	-	0,016	Belzer et al., 2013
	<i>S. cerevisiae</i>	7 л ферментер	3,28	-	0,02	Singh et al., 2013
		7 л ферментер	2,37	73,3	0,018	Mateo et al., 2004
		7 л ферментер	2,3	-	0,015	Dougulis et al., 2011
		5 л ферментер	1,65	55,6	0,014	Gao et al., 2009
		5 л ферментер	1,61	24,4	0,013	Nielsen et al., 2010
	<i>E. coli</i>	7 л ферментер	3,52	50,6	0,029	Kim et al., 2007

^aпродуктивность рассчитывают как общие продуцированные каротеноиды, деленные на общее время ферментации.

Таблица 9. Праймеры, используемые в примере 5.

Crispr-trp-F	GGGTCGGCGCAGGTTGACGTACGCCGAGGAGTGGTACCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC (SEQ ID NO: 31)
Crispr-trp-R	GCTATTTCTAGCTCTAAAACCCGGTACCACTCCTCGGCGTACGTCAACCTGCGCCGACCC (SEQ ID NO: 32)
CrtI-F	ATGAACCAGATGCATAGCACTTAGAAGGCCAGGATGCCCA (SEQ ID NO: 33)
CrtI-R	CATCAACAGTATCTACACGCATGGGCAAGGAACAGGACCA (SEQ ID NO: 34)
CrtYB-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGACCGCTCTGGCCTACTA (SEQ ID NO: 35)
CrtYB-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTACTGGCCCTCCCAGCCAG (SEQ ID NO: 36)
CarB-F	ATGAACCAGATGCATAGCACTTAGATCACGTTAGAGTTGT (SEQ ID NO: 37)
CarB-R	CATCAACAGTATCTACACGCATGTCCAAGAAGCACATCGT (SEQ ID NO: 38)
CarRP-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGCTGCTGACCTACATGGA (SEQ ID NO: 39)
CarRP-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTAGATGGTGTTCAGGTTTC (SEQ ID NO: 40)
GGPPxd-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGGACTACGCCAACATCCT (SEQ ID NO: 41)
GGPPxd-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTACAGGGGAATGTCGGCCA (SEQ ID NO: 42)
tCarRP-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGCTGCTGACCTACATGGA (SEQ ID NO: 39)
tCarRP-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTACAGCTCTTGTCGCACGTCG

	(SEQ ID NO: 43)
mCarRP-1-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGCTGCTGACCTACATGGA (SEQ ID NO: 39)
mCarRP-1-R	TCGCTCGAGGCCCACTTGTAGCCGTCAG (SEQ ID NO: 44)
mCarRP-2-F	ACAAGTGGGGCCTCGAGCGACGATCTATCC (SEQ ID NO: 45)
mCarRP-2-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTAGATGGTGTTCAGGTTTC (SEQ ID NO: 40)
EuCrtY-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGCAGCCCCACTACGACCT (SEQ ID NO: 46)
EuCrtY-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTATCGGTGAGTGGTCATGA (SEQ ID NO: 47)
PaCrtY-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGCCCCGATACGACCTGAT (SEQ ID NO: 48)
PaCrtY-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTACTGCATGGCCTGCTGTC (SEQ ID NO: 49)
PfCrtY-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGTCTTACGACCTGATCCT (SEQ ID NO: 50)
PfCrtY-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTAAGATCGCATCTCGAAGT (SEQ ID NO: 51)
HpCrtY-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGCTGTCTCCCCTGCAGCG (SEQ ID NO: 52)
HpCrtY-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTACTTGATCATGGCTGGAG (SEQ ID NO: 53)
GGPPtc-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGGCCTACACCGCCATGGC (SEQ ID NO: 54)
GGPPtc-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTAGTTCTGTTCGGAAGGCAA (SEQ ID NO: 55)
GGPPpa-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGGTCTCTGGATCTAAGGC (SEQ ID NO: 56)
GGPPpa-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTCAGGCAATCTTCATGACAG (SEQ ID NO: 57)
GGPPyl-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGGATTATAACAGCGCGGA (SEQ ID NO: 58)
GGPPyl-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTCACTGCGCATCCTCAAAGT (SEQ ID NO: 59)
GGPPsa-F	CATTCAAAGGATCCCCTAGGATGTCCTACTTCGACA ACTA (SEQ ID NO: 60)
GGPPsa-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGTTACTTTCGTCGTCGAATGG (SEQ ID NO: 61)
ERG12-F	ATGAACCAGATGCATAGCACCTAATGGGTCCAGGGACCGA (SEQ ID NO: 62)
ERG12-R	ACACAAGACATATCTACAGCATGGACTACATCATTTTCGGC (SEQ ID NO: 63)
tHMGR-F	TTTTGCAGTACTAACC GCAGACCCAGTCTGTGAAGGTGGT (SEQ ID NO: 64)
tHMGR-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGCTATGACCGTATGCAAATAT (SEQ ID NO: 65)
ERG20-F	ATGAACCAGATGCATAGCACCTACTTCTGTCGCTTGTA AA (SEQ ID NO: 66)
ERG20-R	ACACAAGACATATCTACAGCATGTCCAAGGCGAAATTCGA (SEQ ID NO: 67)

IDI-F	TTTTGCAGTACTAACC GCAGACGACGTCTTACAGCGACAA (SEQ ID NO: 68)
IDI-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGCTACTTGATCCACCGCCGAA (SEQ ID NO: 69)
CK-F	ATGAACCAGATGCATAGCACCTACGCATTAATAAACCGGG (SEQ ID NO: 70)
CK-R	ACACAAGACATATCTACAGCATGGCCCCTCAACCCGACCA (SEQ ID NO: 71)
IPK-F	TTTTGCAGTACTAACC GCAGGAAC TGAACATCTCTGAGTC (SEQ ID NO: 72)
IPK-R	GCAAGACCGGCAACGTGGGGT TACTTGAGAAATCGGATGA (SEQ ID NO: 73)
ACT-RT-F	GAGTCACCGGTATCGTTC (SEQ ID NO: 74)
ACT-RT-R	GCGGAGTTGGTGAAAGAG (SEQ ID NO: 75)
CarRP-RT-F	CTGGCCCTGCTGTGGTTCGG (SEQ ID NO: 76)
CarRP-RT-R	CAGGCAGATGGGGCACCACG (SEQ ID NO: 77)

Таблица 10. Состав дрожжевого экстракта (Васто™) и пептона (Васто™).

Состав	Дрожжевой экстракт	Пептон	Состав	Дрожжевой экстракт	Пептон
Общий азот (%)	10,9	15,4	Глутамин (свободного)	0,2	0,0
Аминоазот (%)	6,0	3,5	Глицин (свободного)	1,0	0,7
AN/TN□	0,55	0,20	Глицин (общего)	3,0	15,9
Общие углеводы (мг/г)	163,3	6,29	Гистидин (свободного)	0,4	0,2
Зола (%)	11,2	3,8	Гистидин (общего)	1,3	0,8
Потери при сушке (%)	3,1	2,7	Изолейцин (свободного)	1,8	0,6
NaCl (%)□	0,1	1,7	Изолейцин (общего)	3,0	2,1
pH (1% Раствор)	6,7	7,1	Лейцин (свободного)□	3,0	1,6
Кальций (мкг/г)	130	30	Лейцин (общего)□	4,1	3,8
Железо (мкг/г)	55,3	7,8	Лизин (свободного)□	1,9	2,2
Магний (мкг/г)	750	17	Лизин (общего)	4,6	3,4
Калий (мкг/г)	31950	2487	Метионин (свободного)	0,6	0,3
Натрий (мкг/г)	4900	18127	Метионин (общего)	0,8	0,7
Хлорид (%)	0,38	0,90	Фенилаланин (свободного)	2,0	1,4

Сульфат (%)	0,09	0,32	Фенилаланин (% общего)	2,6	2,8
Фосфат (%)	3,27	0,40	Пролин свободного) □	0,8	0,3
Аланин свободного)	(%4,4	1,2	Пролин общего) □	(%2,0	8,8
Аланин общего)	(%5,6	9,2	Серин свободного) □	(%1,3	0,4
Аргинин свободного)	(%1,4	2,8	Серин общего)	(%1,6	1,5
Аргинин общего)	(%2,6	5,8	Треонин свободного)	(%1,1	0,3
Аспарагин свободного)	(%1,0	0,3	Треонин общего)	(%1,6	1,1
Аспарагиновая кислота свободного)	(%1,6	0,3	Триптофан свободного)	(%0,5	0,3
Аспарагиновая кислота общего)	(%5,3	5,0	Тирозин свободного)	(%0,8	0,5
Цистин свободного)	(%0,2	0,0	Тирозин общего)	(%1,2	0,6
Глутаминовая кислота свободного)	(%6,6	0,7	Валин свободного) □	(%2,2	0,7
Глутаминовая кислота общего)	(%9,4	8,1	Валин общего)	(%3,5	2,8

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Menchik, P.; Zuber, T.; Zuber, A.; Moraru, C. I. Short Communication: Composition of Coproduct Streams from Dairy Processing: Acid Whey and Milk Permeate. *J. Dairy Sci.* 2019, 102 (5), 3978-3984. doi.org/10.3168/jds.2018-15951.
2. Lievore, P.; Simões, D. R. S.; Silva, K. M.; Drunkler, N. L.; Barana, A. C.; Nogueira, A.; Demiate, I. M. Chemical Characterisation and Application of Acid Whey in Fermented Milk. *J. Food Sci. Technol.* 2015, 52 (4), 2083-2092. doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z.
3. Lindsay, M. J.; Walker, T. W.; Dumesic, J. A.; Rankin, S. A.; Huber, G. W. Production of Monosaccharides and Whey Protein from Acid Whey Waste Streams in the Dairy Industry. *Green Chem.* 2018, 20 (8), 1824-1834. doi.org/10.1039/c8gc00517f.
4. Xu, J.; Hao, J.; Guzman, J. J. L.; Spirito, C. M.; Harroff, L. A.; Angenent, L. T. Temperature-Phased Conversion of Acid Whey Waste Into Medium-Chain Carboxylic Acids via Lactic Acid: No External e-Donor. *Joule* 2018, 2 (2), 280-295. doi.org/10.1016/j.joule.2017.11.008.
5. Bentahar, J.; Doyen, A.; Beaulieu, L.; Deschênes, J. S. Acid Whey Permeate: An Alternative Growth Medium for Microalgae *Tetrademus Obliquus* and Production of β -Galactosidase. *Algal Res.* 2019, 41, 101559. doi.org/10.1016/j.algal.2019.101559.
6. Fischer, C.; Kleinschmidt, T. Synthesis of Galactooligosaccharides Using Sweet and

Acid Whey as a Substrate. *Int. Dairy J.* 2015, 48, 15-22. doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003.

7. Skryplonek, K.; Dmytrów, I.; Mituniewicz-Małek, A. Probiotic Fermented Beverages Based on Acid Whey. *J. Dairy Sci.* 2019, 102 (9), 7773-7780. doi.org/10.3168/jds.2019-16385.

8. Carotenoids Market | 2020-2027 | Industry Report | Covid Insights mordorintelligence.com/industry-reports/carotenoids-market-industry (accessed Feb 18, 2021).

9. Mano, J.; Liu, N.; Hammond, J. H.; Currie, D. H.; Stephanopoulos, G. Engineering *Yarrowia Lipolytica* for the Utilization of Acid Whey. *Metab. Eng.* 2020, 57, 43-50. doi.org/10.1016/j.ymben.2019.09.010.

10. 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. doi.org/10.1002/bit.26473.

11. Yamada, E. A.; Sgarbieri, V. C. Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) Protein Concentrate: Preparation, Chemical Composition, and Nutritional and Functional Properties. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 (10), 3931-3936. doi.org/10.1021/jf0400821.

12. Gonçalves, F. A. G.; Colen, G.; Takahashi, J. A. *Yarrowia Lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *Sci. World J.* 2014, 2014. doi.org/10.1155/2014/476207.

13. Qiao, K.; Abidi, S. H. I.; Liu, H.; Zhang, H.; Chakraborty, S.; Watson, N.; Ajikumar, P. K.; Stephanopoulos, G. Engineering Lipid Overproduction in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*. *Metab. Eng.* 2015, 29, 56-65. doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.005.

14. Tai, M.; Stephanopoulos, G. Engineering the Push and Pull of Lipid Biosynthesis in Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica* for Biofuel Production. *Metab. Eng.* 2013, 15 (1), 1-9. doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.007.

15. U.S. Greek Yogurt Market - Statistics & Facts | Statista. [statista.com/topics/2351/greek-yogurt/](https://www.statista.com/topics/2351/greek-yogurt/).

16. Menchik, P., Zuber, T., Zuber, A. & Moraru, C. I. Short communication: Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. *J. Dairy Sci.* 102, 3978-3984 (2019).

17. Lievore, P. et al. Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *J. Food Sci. Technol.* 52, 2083-2092 (2015).

18. Maoka, T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* vol. 741-16 (2020).

19. Bogacz-Radomska, L. & Harasym, J. β -Carotene-properties and production methods. *Food Qual. Saf.* 2, 69-74 (2018).

20. Li, C., Swofford, C. A. & Sinskey, A. J. Modular engineering for microbial production of carotenoids. *Metabolic Engineering Communications* vol. 10 e00118 (2020).

21. Mano, J., Liu, N., Hammond, J. H., Currie, D. H. & Stephanopoulos, G. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the utilization of acid whey. *Metab. Eng.* 57, 43-50 (2020).

22. Anselmo, A. C. et al. A heat-stable microparticle platform for oral micronutrient

delivery. *Sci. Transl. Med.* 11, (2019).

23. Tai, M. & Stephanopoulos, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng.* 15, 1-9 (2013).

24. Xu, P., Qiao, K., Ahn, W. S. & Stephanopoulos, G. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 10848-10853 (2016).

25. Qiao, K., Wasylenko, T. M., Zhou, K., Xu, P. & Stephanopoulos, G. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. *Nat. Biotechnol.* 35, 173-177 (2017).

26. Qiao, K. et al. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* 29, 56-65 (2015).

27. Luo, Z. et al. Enhancing isoprenoid synthesis in *Yarrowia lipolytica* by expressing the isopentenol utilization pathway and modulating intracellular hydrophobicity. *Metab. Eng.* 61, 344-351 (2020).

28. Larroude, M. et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 464-472 (2018).

29. Groenewald, M. et al. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology* vol. 40 187-206 (2014)

30. Carotenoids Market | 2020-2027 | Industry Report | Covid Insights. mordorintelligence.com/industry-reports/carotenoids-market-industry.

31. Carotenoids Market Size, Revenue | Global Industry Trends [2020-2027]. fortunebusinessinsights.com/industry-reports/carotenoids-market-100180.

32. Groenewald, M. et al. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology* vol. 40 187-206 (2014).

33. Xue, Z. et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nat. Biotechnol.* 31, 734-740 (2013).

34. Xie, D., Jackson, E. N. & Zhu, Q. Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1599-1610 (2015).

35. Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M. & Wiebe, M. G. Single Cell Protein- State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001-2016. *Front. Microbiol.* 8, 2009 (2017).

36. Lindsay, M. J., Walker, T. W., Dumesic, J. A., Rankin, S. A. & Huber, G. W. Production of monosaccharides and whey protein from acid whey waste streams in the dairy industry. *Green Chem.* 20, 1824-1834 (2018).

37. Xu, J. et al. Temperature-Phased Conversion of Acid Whey Waste Into Medium-Chain Carboxylic Acids via Lactic Acid: No External e-Donor. *Joule* 2, 280-295 (2018).

38. Bentahar, J., Doyen, A., Beaulieu, L. & Deschênes, J. S. Acid whey permeate: An alternative growth medium for microalgae *Tetradismus obliquus* and production of β -galactosidase. *Algal Res.* 41, 101559 (2019).

39. Fischer, C. & Kleinschmidt, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *Int. Dairy J.* 48, 15-22 (2015).
40. Skryplonek, K., Dmytrów, I. & Mituniewicz-Małek, A. Probiotic fermented beverages based on acid whey. *J. Dairy Sci.* 102, 7773-7780 (2019).
41. Xu, P., Qiao, K. & Stephanopoulos, G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 1521-1530 (2017).
42. Heinzle, E. et al. Ecological and economic objective functions for screening in integrated development of fine chemical processes. 1. Flexible and expandable framework using indices. *Ind. Eng. Chem. Res.* 37, 3395-3407 (1998).
43. Abdel-Mawgoud, A. M., Markham, K. A., Palmer, C. M., Liu, N., Stephanopoulos, G., Alper, H. S., 2018. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* 50, 192-208.
44. Ajikumar, P. K., Xiao, W.-H., Tyo, K. E., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T. H., Pfeifer, B., Stephanopoulos, G., 2010. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science.* 330, 70-74.
45. Ambati, R. R., Phang, S.-M., Ravi, S., Aswathanarayana, R. G., 2014. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review. *Mar. Drugs.* 12, 128-152.
46. Asker, D., 2017. Isolation and characterization of a novel, highly selective astaxanthin-producing marine bacterium. *J. Agric. Food. Chem.* 65, 9101-9109.
47. Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* 33, 1582-1614.
48. Avalos, J. L., Fink, G. R., Stephanopoulos, G., 2013. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat. Biotechnol.* 31, 335.
49. Ayer, A., Sanwald, J., Pillay, B. A., Meyer, A. J., Perrone, G. G., Dawes, I. W., 2013. Distinct redox regulation in sub-cellular compartments in response to various stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 8.
50. Bayer, T. S., Widmaier, D. M., Temme, K., Mirsky, E. A., Santi, D. V., Voigt, C. A., 2009. Synthesis of methyl halides from biomass using engineered microbes. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 6508-6515.
51. Bennedsen, M., Wang, X., Willén, R., Wadström, T., Andersen, L. P., 2000. Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunol. Lett.* 70, 185-189.
52. Cao, X., Yang, S., Cao, C., Zhou, Y. J., 2020. Harnessing sub-organelle metabolism for biosynthesis of isoprenoids in yeast. *Synth. Syst. Biotechnol.* 5, 179-186.
53. Chang, J.-J., Thia, C., Lin, H.-Y., Liu, H.-L., Ho, F.-J., Wu, J.-T., Shih, M.-C., Li,

W.-H., Huang, C.-C., 2015. Integrating an algal β -carotene hydroxylase gene into a designed carotenoid-biosynthesis pathway increases carotenoid production in yeast. *Bioresour. Technol.* 184, 2-8.

54. Chemler, J. A., Koffas, M. A., 2008. Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 597-605.

55. Chew, B., Park, J., Wong, M., Wong, T., 1999. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res.* 19, 1849-1853.

56. Choi, S.-k., Nishida, Y., Matsuda, S., Adachi, K., Kasai, H., Peng, X., Komemushi, S., Miki, W., Misawa, N., 2005. Characterization of β -Carotene Ketolases, CrtW, from Marine Bacteria by Complementation Analysis in *Escherichiacoli*. *Mar. Biotechnol.* 7, 515-522.

57. Cragg, G. M., 1998. Paclitaxel (Taxol®): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Med. Res. Rev.* 18, 315-331.

58. Dhingra, V., Rao, K. V., Narasu, M. L., 1999. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci.* 66, 279-300.

59. Diao, J., Song, X., Zhang, L., Cui, J., Chen, L., Zhang, W., 2020. Tailoring cyanobacteria as a new platform for highly efficient synthesis of astaxanthin. *Metab. Eng.*

60. Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J., 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* 23, 394-411.

61. Farhi, M., Marhevka, E., Masci, T., Marcos, E., Eyal, Y., Ovadis, M., Abeliovich, H., Vainstein, A., 2011. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids. *Metab. Eng.* 13, 474-481.

62. Gong, Z., Wang, H., Tang, J., Bi, C., Li, Q., Zhang, X., 2020. Coordinated expression of astaxanthin biosynthesis genes for improved astaxanthin production in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food. Chem.* 68, 14917-14927.

63. Hama, S., Takahashi, K., Inai, Y., Shiota, K., Sakamoto, R., Yamada, A., Tsuchiya, H., Kanamura, K., Yamashita, E., Kogure, K., 2012. Protective effects of topical application of a poorly soluble antioxidant astaxanthin liposomal formulation on ultraviolet-induced skin damage. *J. Pharm. Sci.* 101, 2909-2916.

64. Hammer, S. K., Avalos, J. L., 2017. Harnessing yeast organelles for metabolic engineering. *Nat. Chem. Biol.* 13, 823.

65. Henke, N. A., Wiebe, D., Pérez-García, F., Peters-Wendisch, P., Wendisch, V. F., 2018. Coproduction of cell-bound and secreted value-added compounds: Simultaneous production of carotenoids and amino acids by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour. Technol.* 247, 744-752.

66. Jiang, G., Yang, Z., Wang, Y., Yao, M., Chen, Y., Xiao, W., Yuan, Y., 2020. Enhanced astaxanthin production in yeast via combined mutagenesis and evolution. *Biochem. Eng. J.* 156, 107519.

67. Jin, J., Wang, Y., Yao, M., Gu, X., Li, B., Liu, H., Ding, M., Xiao, W., Yuan, Y.,

2018. Astaxanthin overproduction in yeast by strain engineering and new gene target uncovering. *Biotechnol. Biofuels.* 11, 230.

68. Kildegaard, K. R., Adiego-Pérez, B., Belda, D. D., Khangura, J. K., Holkenbrink, C., Borodina, I., 2017. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2, 287-294.

69. Larroude, M., Celinska, E., Back, A., Thomas, S., Nicaud, J. M., Ledesma- Amaro, R., 2018. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β - carotene. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 464-472.

70. Lemuth, K., Steuer, K., Albermann, C., 2011. Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved in vivo biosynthesis of astaxanthin. *Microb. Cell Fact.* 10, 29.

71. Li, N., Han, Z., O'Donnell, T. J., Kurasaki, R., Kajihara, L., Williams, P. G., Tang, Y., Su, W. W., 2020. Production and excretion of astaxanthin by engineered *Yarrowia lipolytica* using plant oil as both the carbon source and the biocompatible extractant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1-13.

72. Liu, G.-S., Li, T., Zhou, W., Jiang, M., Tao, X.-Y., Liu, M., Zhao, M., Ren, Y.-H., Gao, B., Wang, F.-Q., 2020. The yeast peroxisome: A dynamic storage depot and subcellular factory for squalene overproduction. *Metab. Eng.* 57, 151-161.

73. Lu, Q., Bu, Y.-F., Liu, J.-Z., 2017. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing astaxanthin as the predominant carotenoid. *Mar. Drugs.* 15, 296.

74. Ma, T., Zhou, Y., Li, X., Zhu, F., Cheng, Y., Liu, Y., Deng, Z., Liu, T., 2016. Genome mining of astaxanthin biosynthetic genes from *Sphingomonas* sp. ATCC 55669 for heterologous overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnology journal.* 11, 228-237.

75. Martin, V. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., Keasling, J. D., 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21, 796-802.

76. Nogueira, M., Enfissi, E. M. A., Welsch, R., Beyer, P., Zurbriggen, M. D., Fraser, P. D., 2019. Construction of a fusion enzyme for astaxanthin formation and its characterisation in microbial and plant hosts: A new tool for engineering ketocarotenoids. *Metab. Eng.* 52, 243-252.

77. Park, S. Y., Binkley, R. M., Kim, W. J., Lee, M. H., Lee, S. Y., 2018. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity. *Metab. Eng.* 49, 105-115.

78. Qi, D.-D., Jin, J., Liu, D., Jia, B., Yuan, Y.-J., 2020. In vitro and in vivo recombination of heterologous modules for improving biosynthesis of astaxanthin in yeast. *Microb. Cell Fact.* 19, 1-12.

79. Scaife, M. A., Burja, A. M., Wright, P. C., 2009. Characterization of cyanobacterial β - carotene ketolase and hydroxylase genes in *Escherichia coli*, and their application for astaxanthin biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 944-955.

80. Scaife, M. A., Ma, C. A., Ninlayarn, T., Wright, P. C., Armenta, R. E., 2012. Comparative analysis of β -carotene hydroxylase genes for astaxanthin biosynthesis. *J. Nat. Prod.*

75, 1117-1124.

81. Sheng, J., Stevens, J., Feng, X., 2016. Pathway compartmentalization in peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* to produce versatile medium chain fatty alcohols. *Sci. Rep.* 6, 1-11.

82. Szczebara, F. M., Chandelier, C., Villeret, C., Masurel, A., Bourot, S., Dupont, C., Blanchard, S., Groisillier, A., Testet, E., Costaglioli, P., 2003. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat. Biotechnol.* 21, 143-149.

83. Thodey, K., Galanie, S., Smolke, C. D., 2014. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. *Nat. Chem. Biol.* 10, 837.

84. Tramontin, L. R. R., Kildegaard, K. R., Sudarsan, S., Borodina, I., 2019. Enhancement of astaxanthin biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* via microalgal pathway. *Microorganisms.* 7, 472.

85. Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., Takagi, H., 2009. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7205-7211.

86. Wang, R., Gu, X., Yao, M., Pan, C., Liu, H., Xiao, W., Wang, Y., Yuan, Y., 2017. Engineering of β -carotene hydroxylase and ketolase for astaxanthin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Chem. Sci. Eng.* 11, 89-99.

87. Xu, P., Qiao, K., Ahn, W. S., Stephanopoulos, G., 2016. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113, 10848-10853.

88. Yang, K., Qiao, Y., Li, F., Xu, Y., Yan, Y., Madzak, C., Yan, J., 2019. Subcellular engineering of lipase dependent pathways directed towards lipid related organelles for highly effectively compartmentalized biosynthesis of triacylglycerol derived products in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* 55, 231-238.

89. Yuan, J., Ching, C.-B., 2016. Mitochondrial acetyl-CoA utilization pathway for terpenoid productions. *Metab. Eng.* 38, 303-309.

90. Zhang, C., Seow, V. Y., Chen, X., Too, H.-P., 2018. Multidimensional heuristic process for high-yield production of astaxanthin and fragrance molecules in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* 9, 1858.

91. Zhou, P., Li, M., Shen, B., Yao, Z., Bian, Q., Ye, L., Yu, H., 2019. Directed coevolution of β -carotene ketolase and hydroxylase and its application in temperature-regulated biosynthesis of astaxanthin. *J. Agric. Food. Chem.* 67, 1072-1080.

92. Zhou, P., Xie, W., Li, A., Wang, F., Yao, Z., Bian, Q., Zhu, Y., Yu, H., Ye, L., 2017. Alleviation of metabolic bottleneck by combinatorial engineering enhanced astaxanthin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 100, 28-36.

93. Zhou, P., Ye, L., Xie, W., Lv, X., Yu, H., 2015. Highly efficient biosynthesis of astaxanthin in *Saccharomyces cerevisiae* by integration and tuning of algal *crtZ* and *bkt*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8419-8428.

94. Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J., Tang, K., 2009. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 279-

291.

95. Zhou, Y. J., Buijs, N. A., Zhu, Z., Gómez, D. O., Boonsombuti, A., Siewers, V., Nielsen, J., 2016. Harnessing yeast peroxisomes for biosynthesis of fatty-acid-derived biofuels and chemicals with relieved side-pathway competition. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 15368-15377.

96. Chen Y, Nielsen J. Advances in metabolic pathway and strain engineering paving the way for sustainable production of chemical building blocks. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 965-972 (2013).

97. Li Y, Smolke CD. Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast. *Nat. Commun.* 7, 12137 (2016).

98. Liu Y, Nielsen J. Recent trends in metabolic engineering of microbial chemical factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* 60, 188-197 (2019).

99. Wu G, Yan Q, Jones JA, Tang YJ, Fong SS, Koffas MA. Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications. *Trends Biotechnol.* 34, 652-664 (2016).

100. Keasling JD. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science* 330, 1355-1358 (2010).

101. Reed MC, Lieb A, Nijhout HF. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bioessays* 32, 422-429 (2010).

102. Boutin JA, Chatelain-Egger F, Vella F, Delagrangé P, Ferry G. Quinone reductase 2 substrate specificity and inhibition pharmacology. *Chem. Biol. Interact.* 151, 213-228 (2005).

103. Belzer M, Morales M, Jagadish B, Mash EA, Wright SH. Substrate-dependent ligand inhibition of the human organic cation transporter OCT2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 346, 300-310 (2013).

104. Singh RK, Tiwari MK, Singh R, Lee J-K. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1232-1277 (2013).

105. Mateo C, et al. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnol. Prog.* 20, 1259-1262 (2004).

106. Daugulis AJ, Tomei MC, Guieysse B. Overcoming substrate inhibition during biological treatment of monoaromatics: recent advances in bioprocess design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1589-1608 (2011).

107. Gao F, Daugulis AJ. Bioproduction of the aroma compound 2-phenylethanol in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor system by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 332-339 (2009).

108. Nielsen DR, Amarasiriwardena GS, Prather KL. Predicting the adsorption of second generation biofuels by polymeric resins with applications for in situ product recovery (ISPR). *Bioresour. Technol.* 101, 2762-2769 (2010).

109. Kim PY, Pollard DJ, Woodley JM. Substrate supply for effective biocatalysis. *Biotechnol. Prog.* 23, 74-82 (2007).

110. Chen C, et al. Structure-based mutational studies of substrate inhibition of betaine aldehyde dehydrogenase BetB from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3992-4002 (2014).
111. Shang Y-P, Chen Q, Li A-T, Quan S, Xu J-H, Yu H-L. Attenuated substrate inhibition of a haloketone reductase via structure-guided loop engineering. *J. Biotechnol.* 308, 141-147 (2020).
112. Verdoes JC, Misawa N, van Ooyen AJ. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 750-755 (1999).
113. Verdoes J, Krubasik P, Sandmann G, Van Ooyen A. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 453-461 (1999).
114. Velayos A, Blasco JL, Alvarez MI, Iturriaga EA, Eslava AP. Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* 210, 938-946 (2000).
115. Velayos A, Eslava AP, Iturriaga EA. A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5509-5519 (2000).
116. Yang J, Anishchenko I, Park H, Peng Z, Ovchinnikov S, Baker D. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 1496-1503 (2020).
117. Ro D-K, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440, 940-943 (2006).
118. Westfall PJ, et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E111-E118 (2012).
119. Chatzivasileiou AO, Ward V, Edgar SM, Stephanopoulos G. Two-step pathway for isoprenoid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 506-511 (2019).
120. Clomburg JM, Qian S, Tan Z, Cheong S, Gonzalez R. The isoprenoid alcohol pathway, a synthetic route for isoprenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 12810-12815 (2019).
121. Rico J, et al. Exploring natural biodiversity to expand access to microbial terpene synthesis. *Microb. Cell Fact.* 18, 23 (2019).
122. Lund S, Hall R, Williams GJ. An artificial pathway for isoprenoid biosynthesis decoupled from native hemiterpene metabolism. *ACS Synth. Biol.* 8, 232-238 (2019).
123. Qiao K, Wasylenko TM, Zhou K, Xu P, Stephanopoulos G. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. *Nat. Biotechnol.* 35, 173 (2017).
124. Ma T, et al. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene. *Metab. Eng.* 52, 134-142

(2019).

125. Larroude M, Celinska E, Back A, Thomas S, Nicaud JM, Ledesma- Amaro R. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β - carotene. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 464-472 (2018).

126. Braunwald T, et al. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6581-6588 (2013).

127. Somashekar D, Joseph R. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 491-493 (2000).

128. Wang W, et al. Harnessing the intracellular triacylglycerols for titer improvement of polyketides in *Streptomyces*. *Nat. Biotechnol.* 38, 76-83 (2020).

129. Xu P, Qiao K, Ahn WS, Stephanopoulos G. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 10848-10853 (2016).

130. Reetz MT. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 12480-12496 (2013).

131. Tan SZ, Manchester S, Prather KL. Controlling central carbon metabolism for improved pathway yields in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* 5, 116-124 (2016).

132. Zhao EM, et al. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production. *Nature* 555, 683 (2018).

133. Brockman IM, Prather KL. Dynamic knockdown of *E. coli* central metabolism for redirecting fluxes of primary metabolites. *Metab. Eng.* 28, 104-113 (2015).

134. Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, Wheeldon I. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth. Biol.* 5, 356-359 (2016).

135. Millard P, Letisse F, Sokol S, Portais J-C. IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. *Bioinformatics* 28, 1294-1296 (2012).

136. Asker D. Isolation and characterization of a novel, highly selective astaxanthin-producing marine bacterium. *J. Agric. Food. Chem.* 65, 9101-9109 (2017).

137. Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* 272, 51-64 (1996).

138. Altschul SF, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402 (1997).

139. Suzek BE, Huang H, McGarvey P, Mazumder R, Wu CH. UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics* 23, 1282-1288 (2007).

140. Pedregosa F, et al. Scikit-learn: Machine learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* 12, 2825-2830 (2011).

141. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307-321 (2010).

142. Larroude M, Celinska E, Back A, Thomas S, Nicaud JM, Ledesma- Amaro R. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β - carotene. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 464-472 (2018).
143. Gao S, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production. *Metab. Eng.* 41, 192-201 (2017).
144. Xie W, Ye L, Lv X, Xu H, Yu H. Sequential control of biosynthetic pathways for balanced utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 28, 8-18 (2015).
145. Yang J, Guo L. Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways. *Microb. Cell Fact.* 13, 160 (2014).
146. Zhao J, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metab. Eng.* 17, 42-50 (2013).
147. Li Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metab. Eng.* 31, 13-21 (2015).
148. Luo Z, et al. Enhancing isoprenoid synthesis in *Yarrowia lipolytica* by expressing the isopentenol utilization pathway and modulating intracellular hydrophobicity. *Metab. Eng.* 61, 344-351 (2020).
149. hi B, et al. Systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lycopene overproduction. *J. Agric. Food. Chem.* 67, 11148-11157 (2019).
150. Ma T, et al. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene. *Metab. Eng.* 52, 134-142 (2019).
151. Kang W, et al. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux. *Nat. Commun.* 10, 1-11 (2019).
152. Chen Y, Xiao W, Wang Y, Liu H, Li X, Yuan Y. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. *Microb. Cell Fact.* 15, 113 (2016).
153. Xie W, Lv X, Ye L, Zhou P, Yu H. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering. *Metab. Eng.* 30, 69-78 (2015).
154. Sun T, et al. Production of lycopene by metabolically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 36, 1515-1522 (2014).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически модифицированная клетка дрожжей (модифицированная клетка), содержащая:

(i) гетерологичный ген, где гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-галактозидазы (LacA);

(ii) один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов, способных превращать молочную кислоту в пируват;

(iii) один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути Лелуара; и

(iv) один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути мевалоната.

2. Модифицированная клетка по п.1, представляющая собой жиροобразующую клетку дрожжей.

3. Модифицированная клетка по п.2, где жиροобразующая клетка представляет собой клетку *Yarrowia lipolytica*.

4. Модифицированная клетка по любому из пп. 1-3, где один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов, способных превращать молочную кислоту в пируват, выбран/выбраны из группы, состоящей из транспортера лактата (JEN1) и лактатдегидрогеназы (LDH).

5. Модифицированная клетка по любому из пп. 1-4, где один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути Лелуара, выбран/выбраны из группы, состоящей из GAL10M, GAL1, GAL7 и GAL10E.

6. Модифицированная клетка по любому из пп. 1-5, где один или несколько гетерологичных генов, кодирующих один или несколько ферментов пути мевалоната, выбран/выбраны из группы, состоящей из GGPPS, CarRP и CarB.

7. Модифицированная клетка по п.6, где GGPPS представляет собой GGPPSxd, происходящий из *Xanthophyllomyces dendrorhous*, GGPPSsa, происходящий из *Sulfolobus acidocaldarius*, GGPPStc, происходящий из *Taxus canadensis*, GGPPSpa, происходящий из *Pantoea agglomerans*, GGPPSyl, происходящий из *Yarrowia lipolytica*.

8. Модифицированная клетка по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащая гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы.

9. Модифицированная клетка по п.8, где фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 1.

10. Модифицированная клетка по п.9, где фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2-4.

11. Модифицированная клетка по п.10, дополнительно содержащая гетерологичный ген, кодирующий tHMGR, ERG12, IDI и ERG20 из пути мевалоната (MVA), и/или холинкиназу (СК) и изопентенилфосфаткиназу (IPK).

12. Модифицированная клетка по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащая:
- (i) гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-каротинкетолазы (CrtW); и
 - (ii) гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-каротингидроксилазы (CrtZ).
13. Модифицированная клетка по п.12, где фермент, имеющий активность CrtW, является слитым с ферментом, имеющим активность CrtZ (слитый фермент CrtW/CrtZ).
14. Модифицированная клетка по п.13, где слитый фермент CrtW/CrtZ содержит сигнал локализации.
15. Модифицированная клетка по п.14, где сигнал локализации нацеливает слитый фермент CrtW/CrtZ на эндоплазматический ретикулум, пероксисому и/или липидные тельца.
16. Модифицированная клетка по любому из пп. 1-15, дополнительно содержащая гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, и/или гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность эпсилон-ликопинциклазы.
17. Модифицированная клетка по п.16, где фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 1.
18. Модифицированная клетка по п.16 или 17, дополнительно содержащая гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность каротеноидгидроксилазы 1 (LUT1), и/или гетерологичный ген, кодирующий фермент, имеющий активность каротеноидгидроксилазы 5 (LUT5).
19. Генетически модифицированная клетка дрожжей (модифицированная клетка), содержащая:
- (i) первый гетерологичный ген, где первый гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-каротинкетолазы (CrtW); и
 - (ii) второй гетерологичный ген, где второй гетерологичный ген кодирует фермент, имеющий активность бета-каротингидроксилазы (CrtZ);
- где модифицированная клетка продуцирует бета-каротин.
20. Модифицированная клетка по п.19, где модифицированная клетка представляет собой жиροобразующую клетку дрожжей.
21. Модифицированная клетка по п.20, где жиροобразующая клетка представляет собой клетку *Yarrowia lipolytica*.
22. Модифицированная клетка по любому из пп. 19-21, где фермент, имеющий активность CrtW, является слитым с ферментом, имеющим активность CrtZ.
23. Модифицированная клетка по п.22, где слитый фермент CrtW/CrtZ содержит сигнал локализации.

24. Модифицированная клетка по п.23, где сигнал локализации нацеливает слитый фермент CrtW/CrtZ на эндоплазматический ретикулум, пероксисому и/или липидные тельца.

25. Способ превращения источника углерода в ликопин и/или бета-каротин, включающий:

(i) приведение в контакт модифицированной клетки по любому из пп. 1-11 с источником углерода; и

(ii) инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в ликопин и/или бета-каротин.

26. Способ по п.25, где источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

27. Способ по п.25 или 26, где источник углерода превращают в ликопин.

28. Способ по п.25 или 26, где источник углерода превращают в бета-каротин.

29. Способ превращения источника углерода в астаксантин, включающий:

(i) приведение в контакт модифицированной клетки по любому из пп. 12-15 или 19-24 с источником углерода; и

(ii) инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в астаксантин.

30. Способ по п.29, где источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

31. Способ превращения источника углерода в альфа-каротин, включающий:

(i) приведение в контакт модифицированной клетки по любому из пп. 1-18 с источником углерода; и

(ii) инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в альфа-каротин.

32. Способ по п.31, где источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

33. Способ превращения источника углерода в лютеин, включающий:

(i) приведение в контакт модифицированной клетки по любому из пп. 1-18 с источником углерода; и

(ii) инкубацию модифицированной клетки с источником углерода в течение достаточного времени для превращения источника углерода в лютеин.

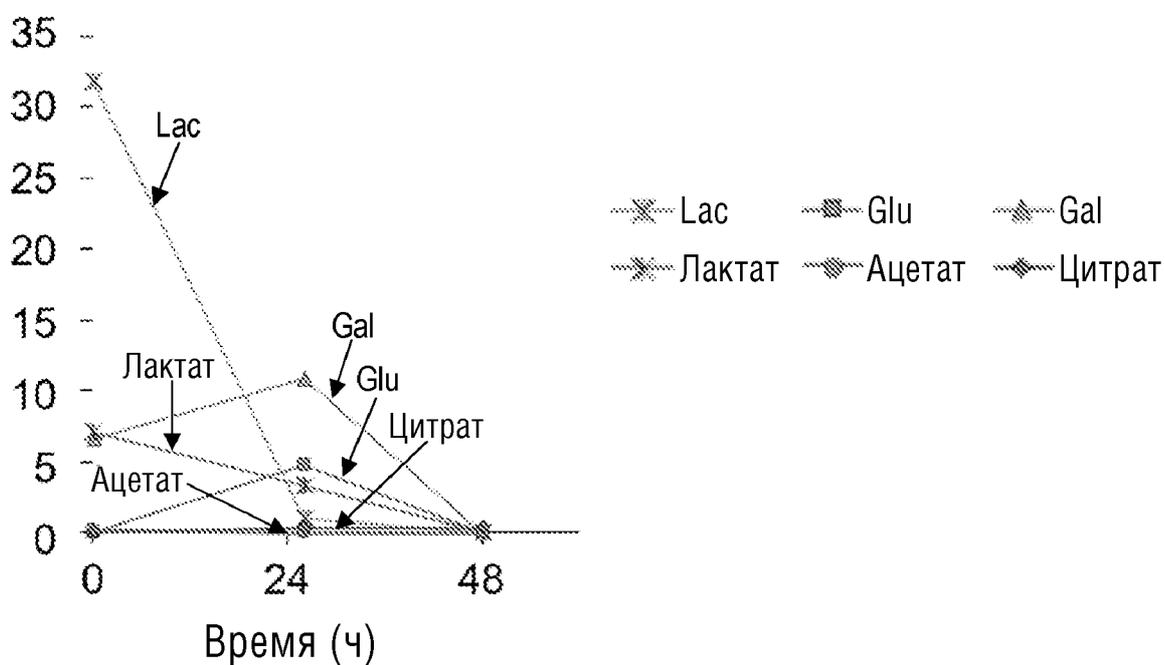
34. Способ по п.33, где источник углерода представляет собой кислую сыворотку.

35. Фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2.

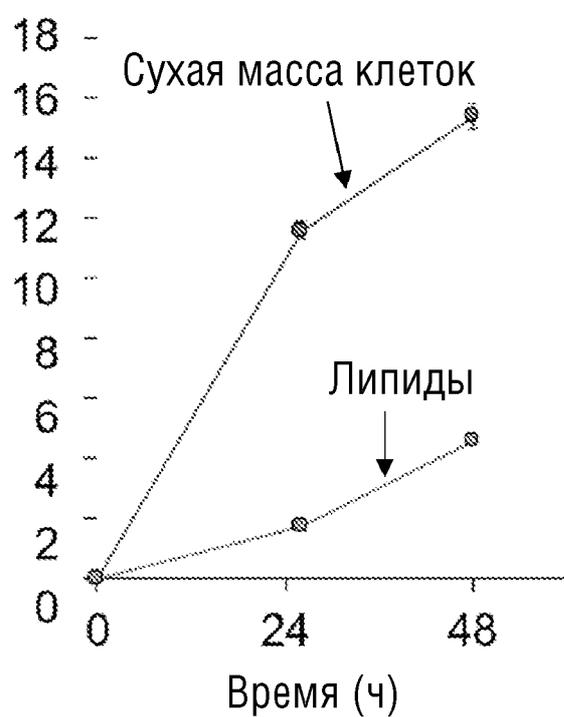
36. Фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3.

37. Фермент, имеющий активность бета-ликопинциклазы, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4.

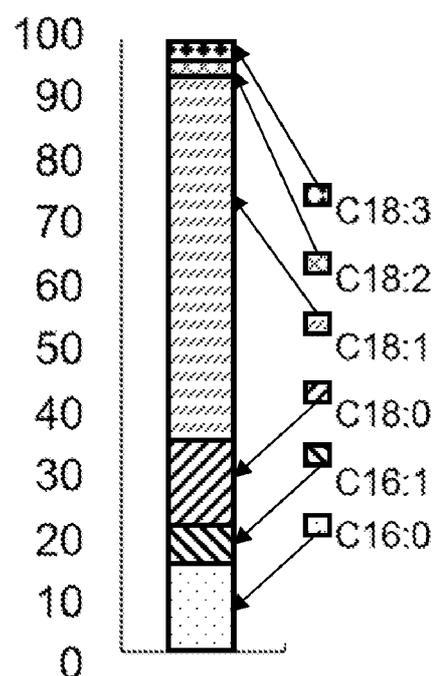
ФИГ.1А



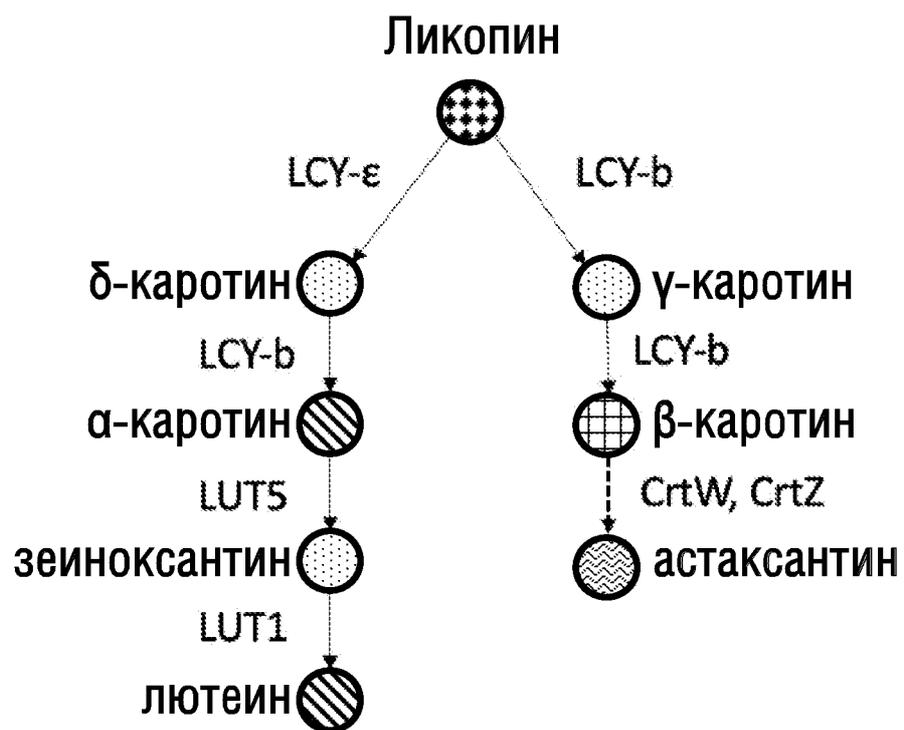
ФИГ.1В



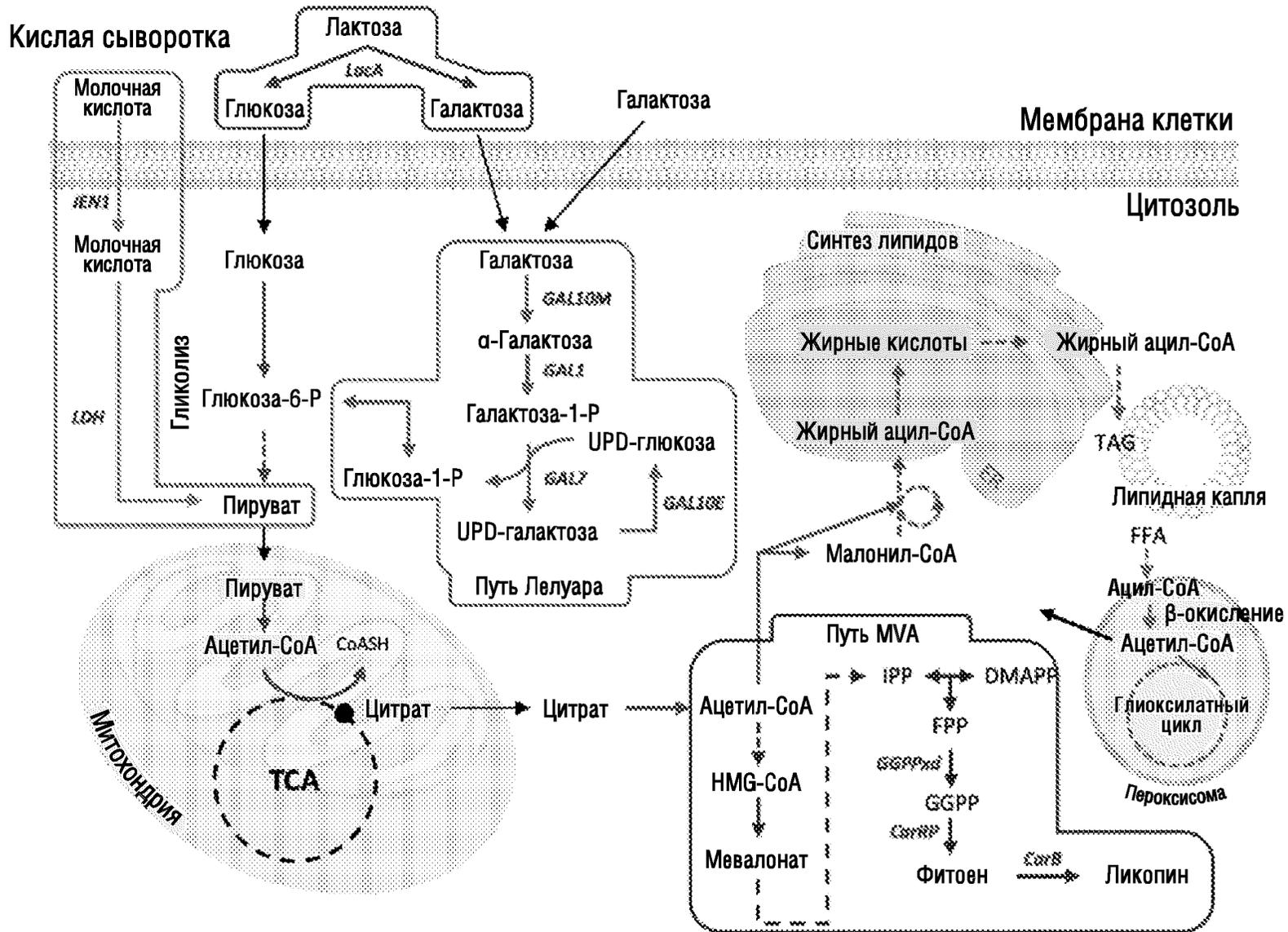
ФИГ.1С



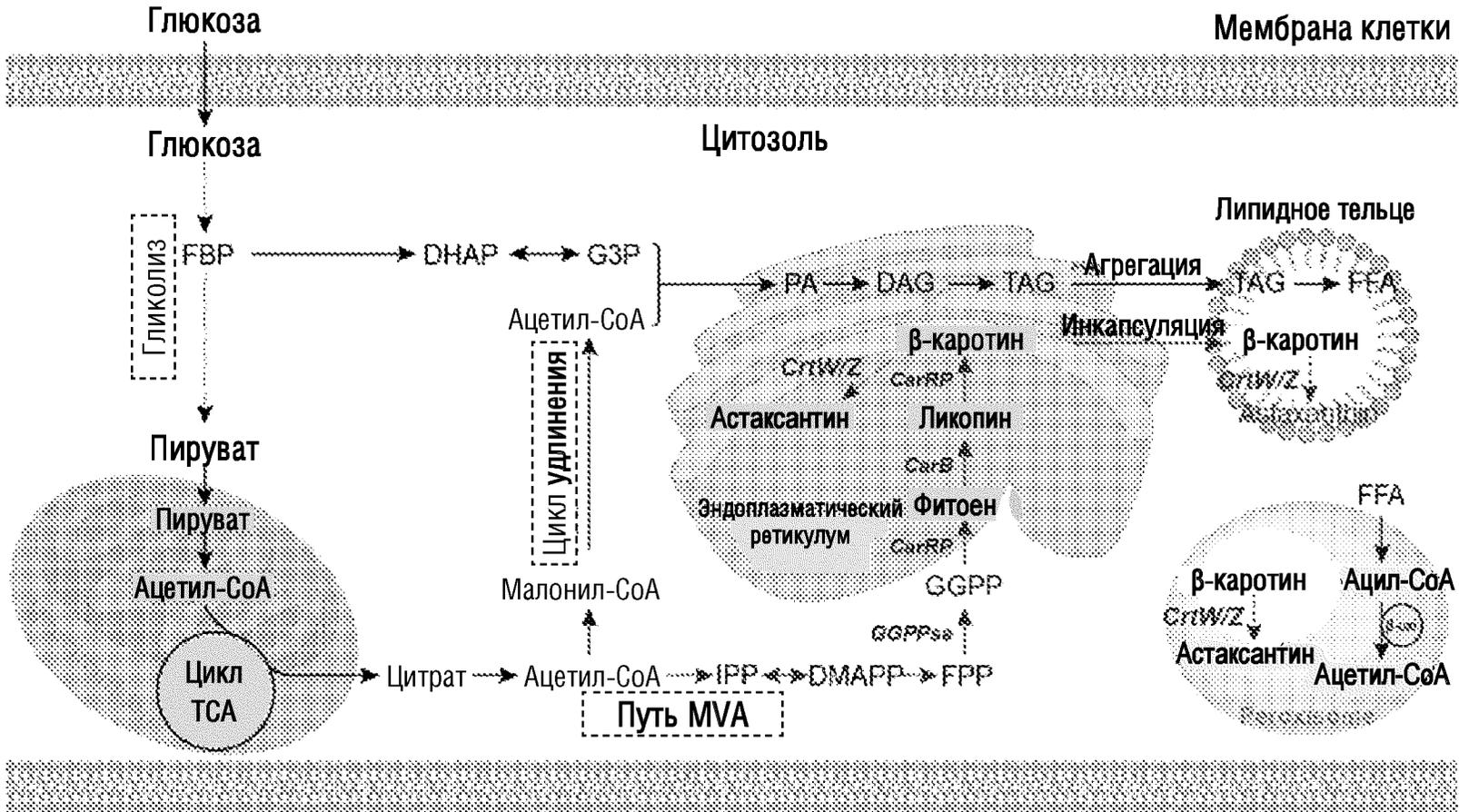
ФИГ.2



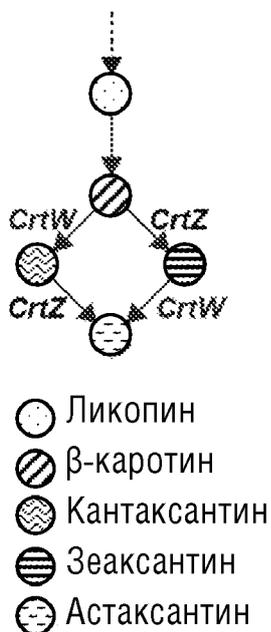
ФИГ.3



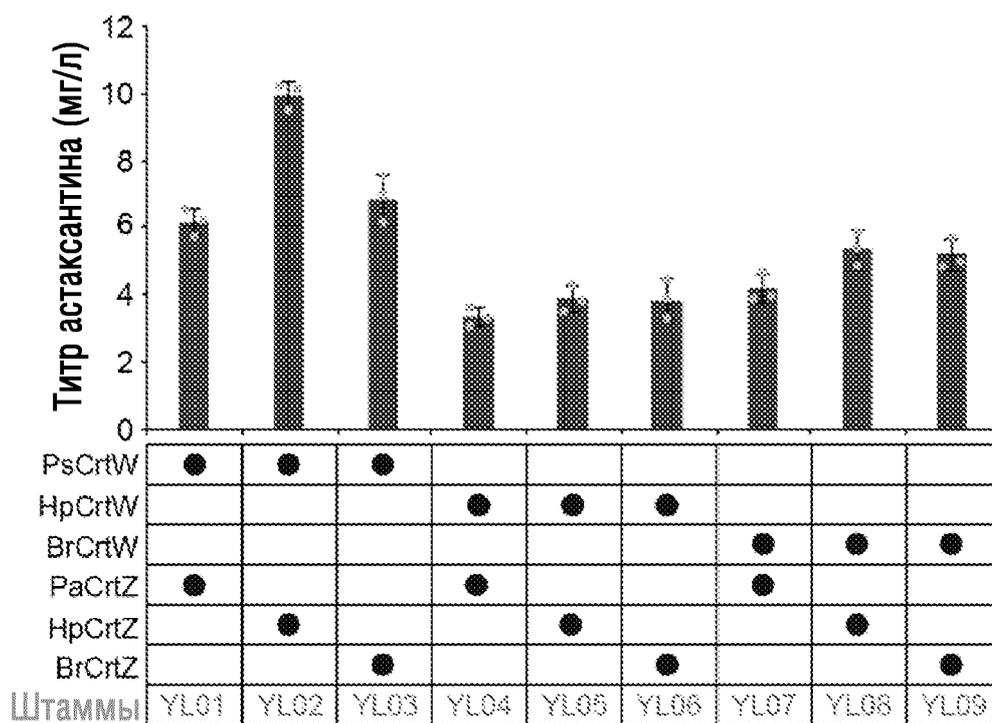
ФИГ.4



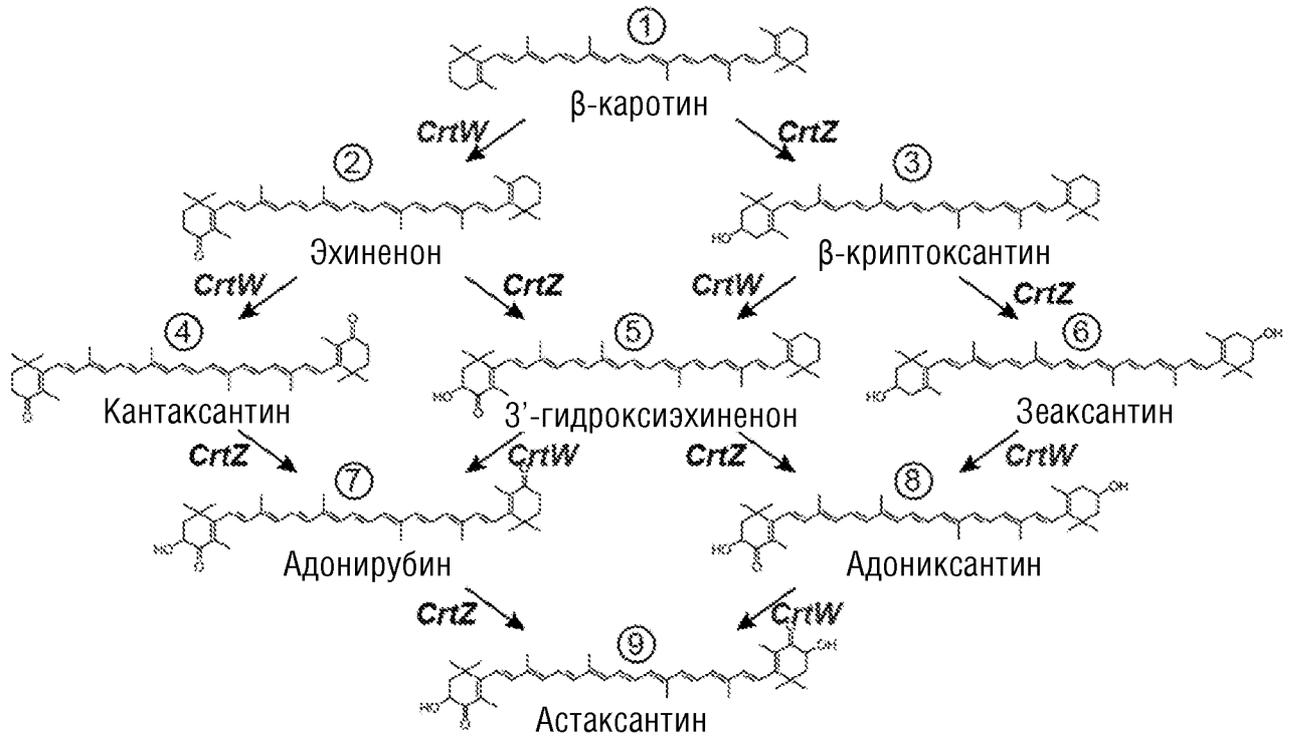
ФИГ.5А



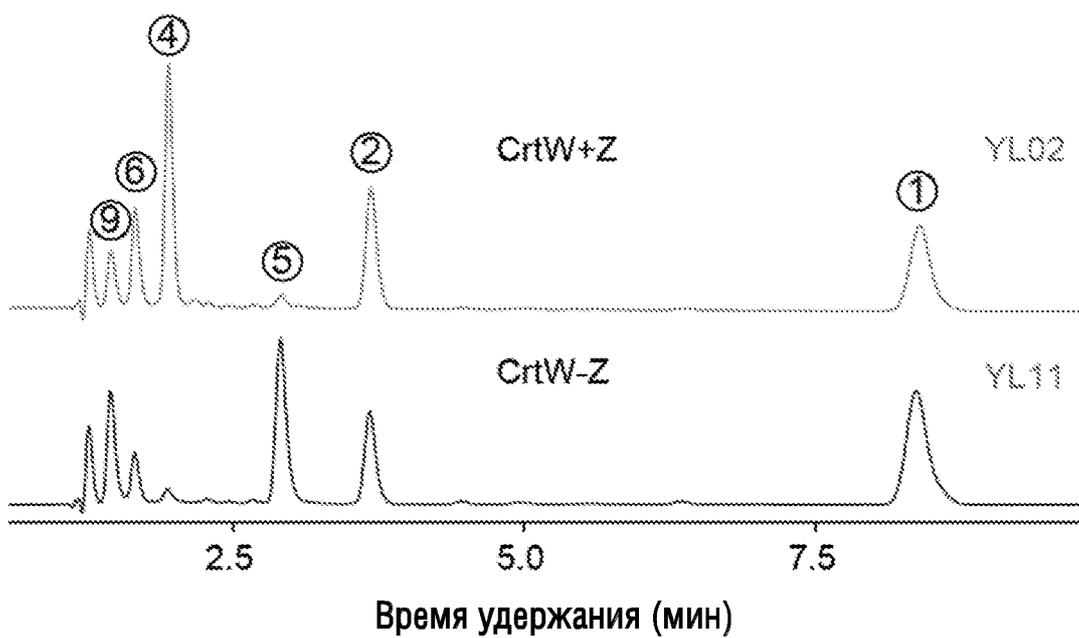
ФИГ.5В



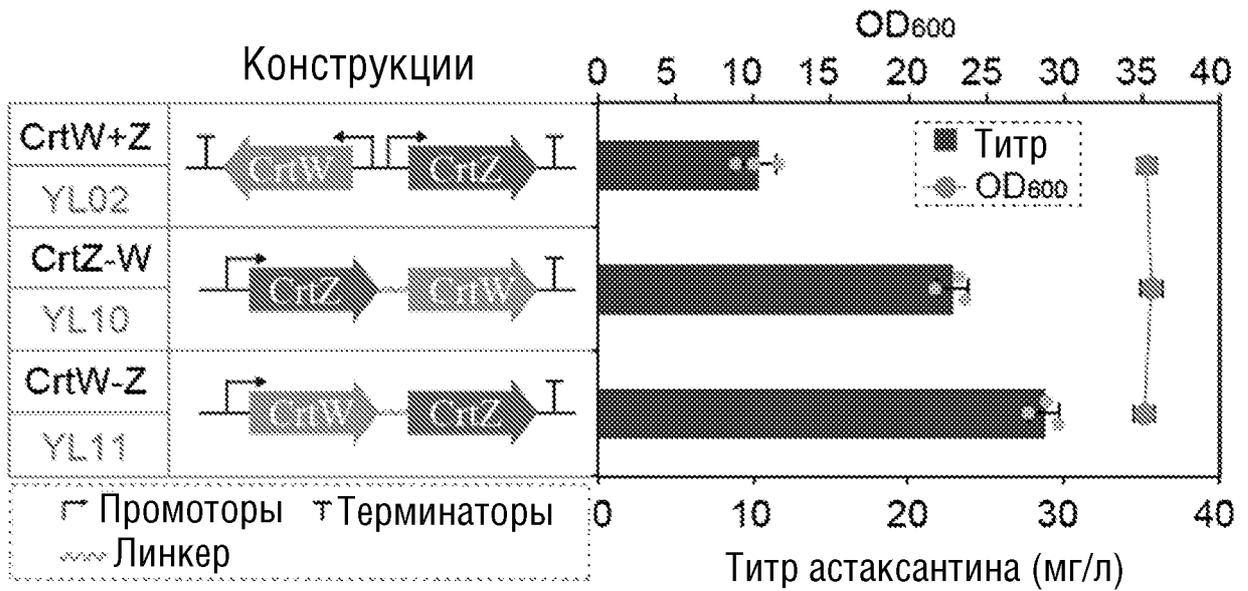
ФИГ.6А



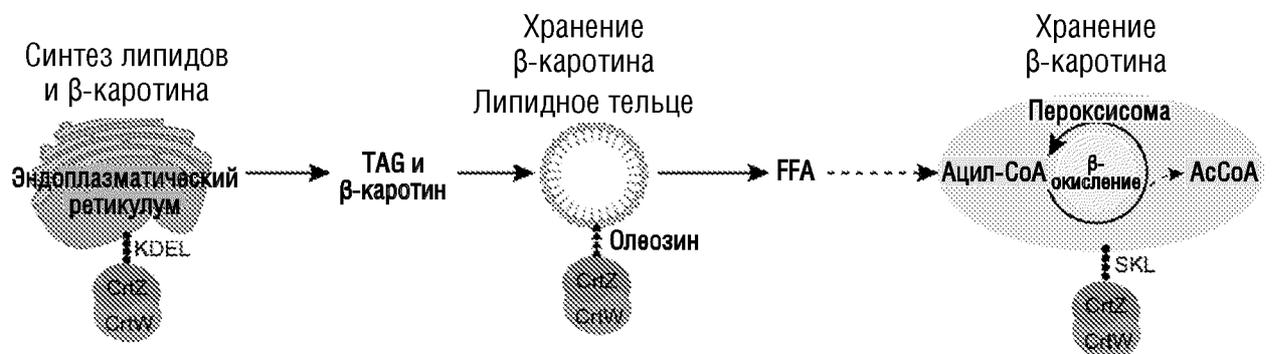
ФИГ.6В



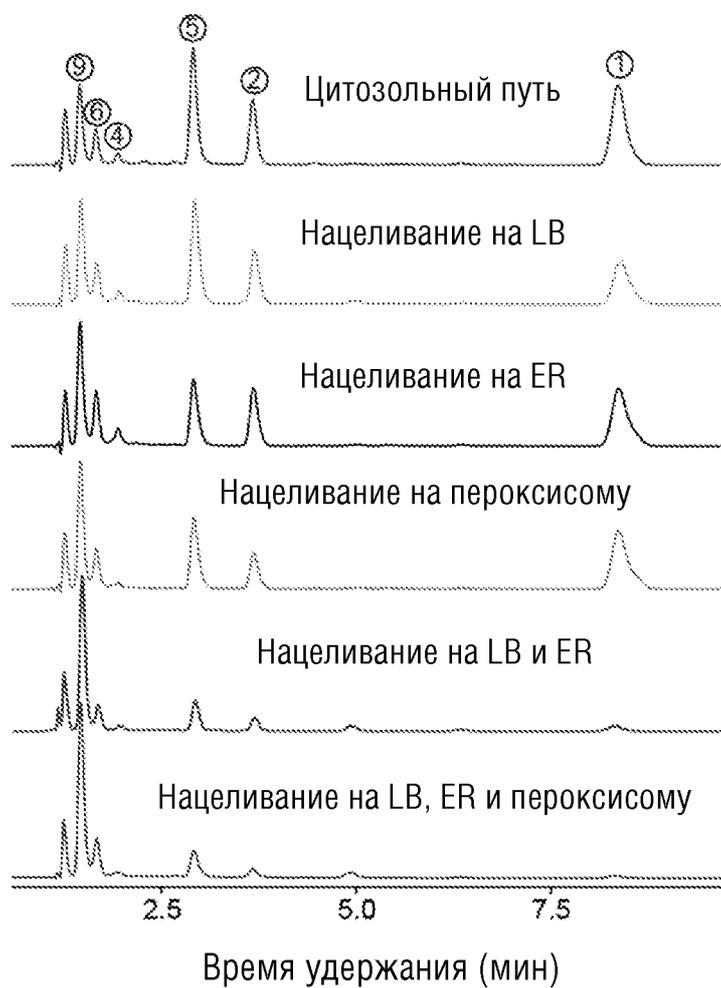
ФИГ.6С



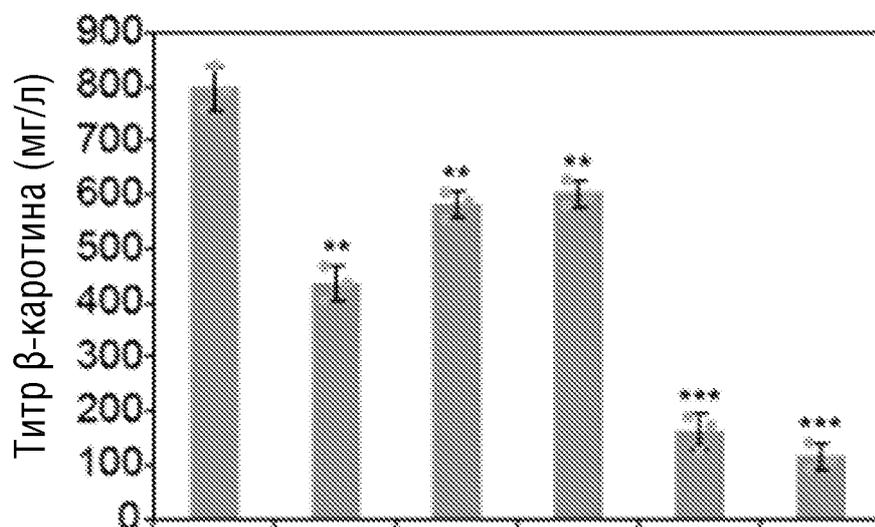
ФИГ.7А



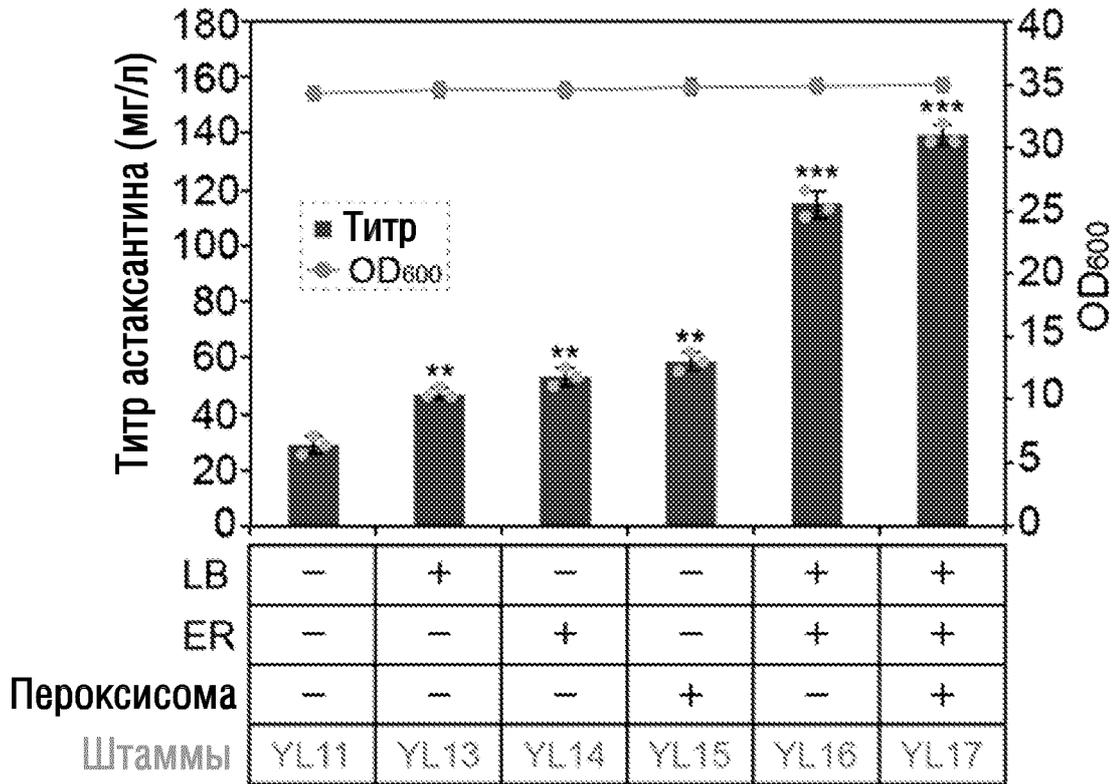
ФИГ.7В



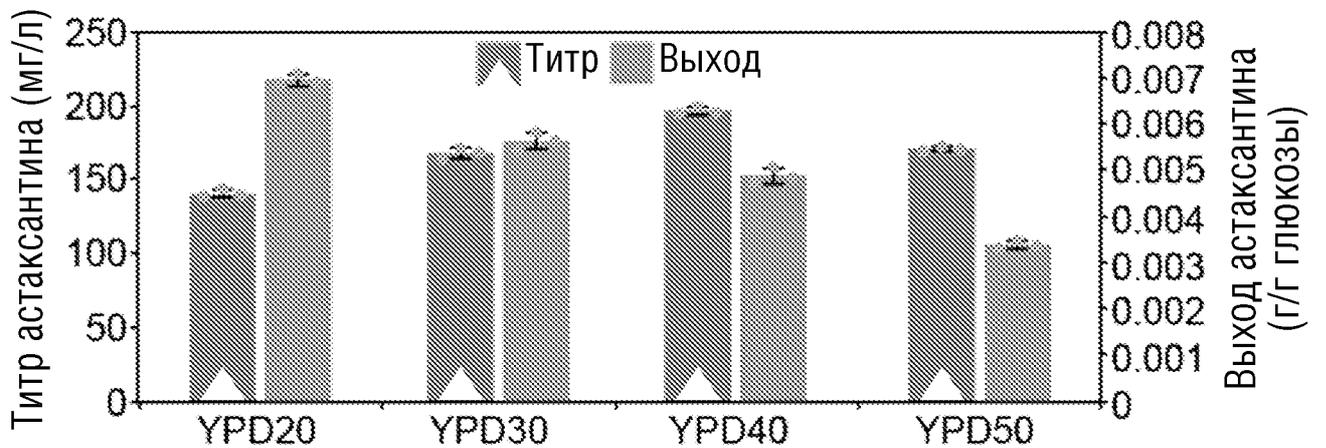
ФИГ.7С



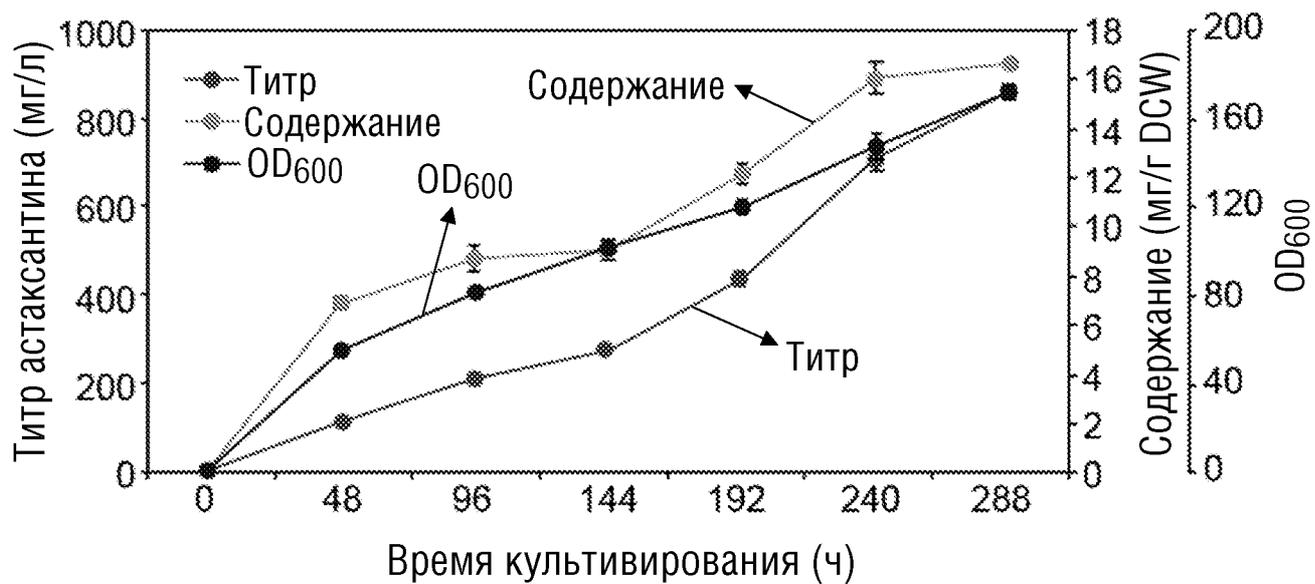
ФИГ.7D



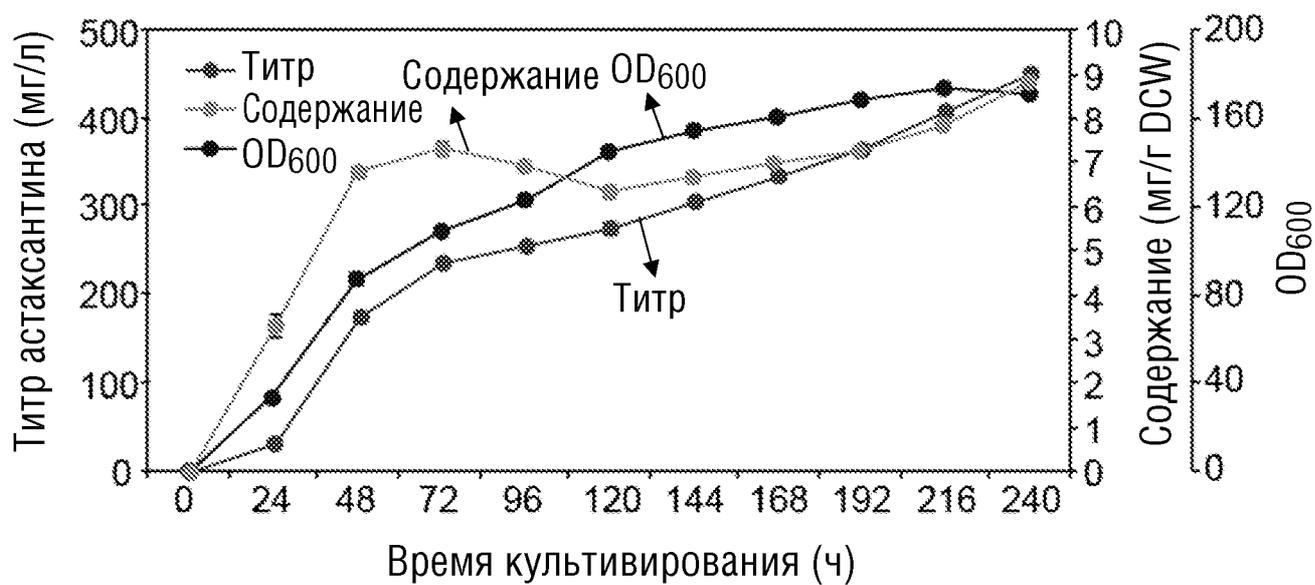
ФИГ.8А



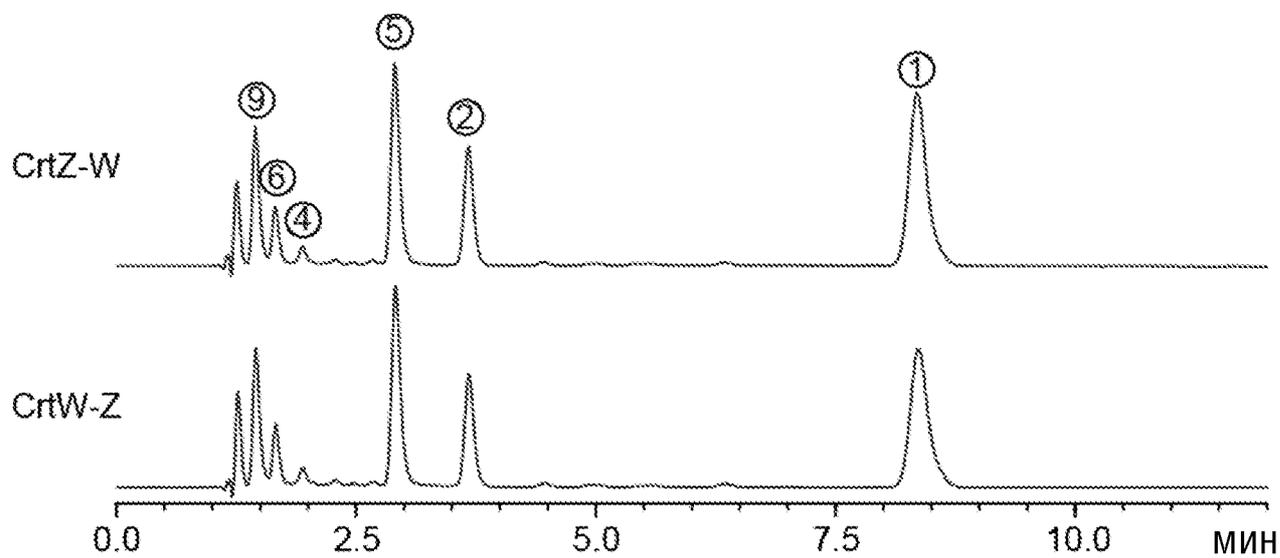
ФИГ.8В



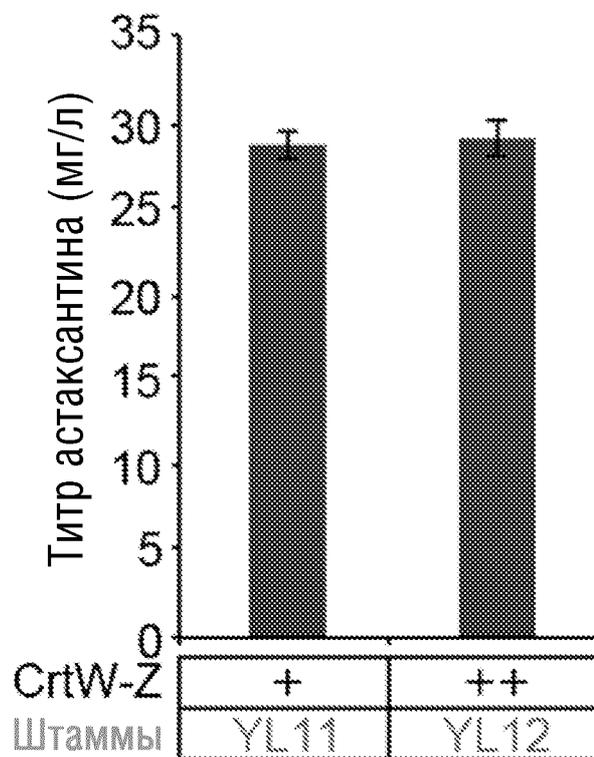
ФИГ.8С



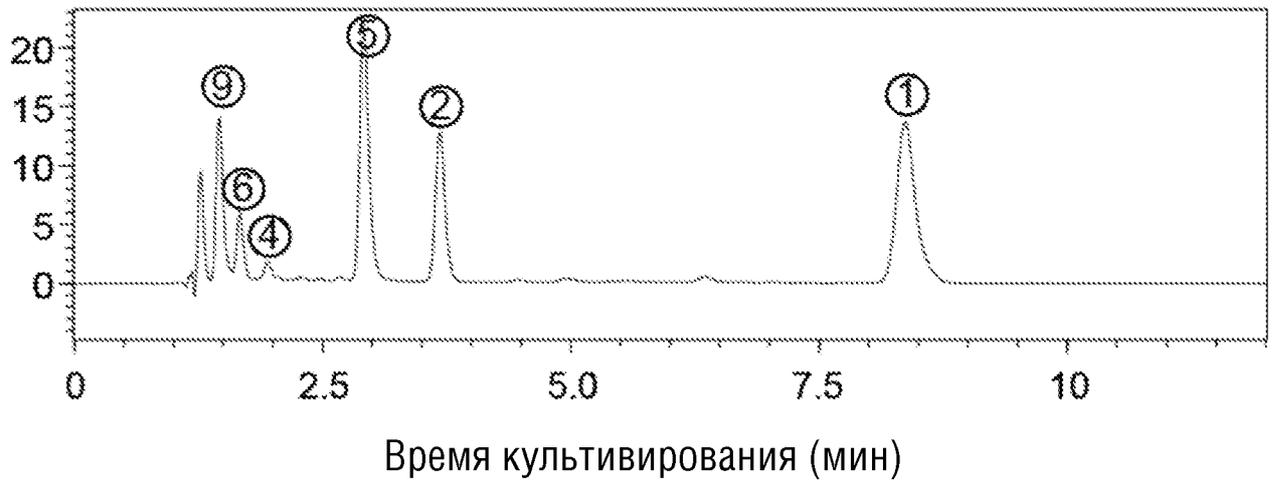
ФИГ.9



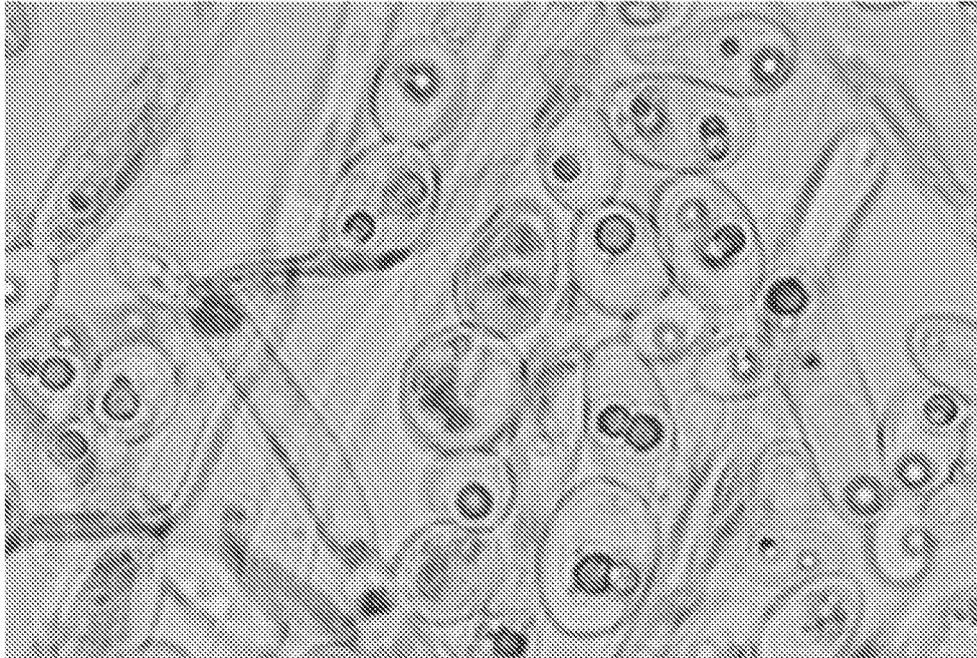
ФИГ.10А



ФИГ.10В



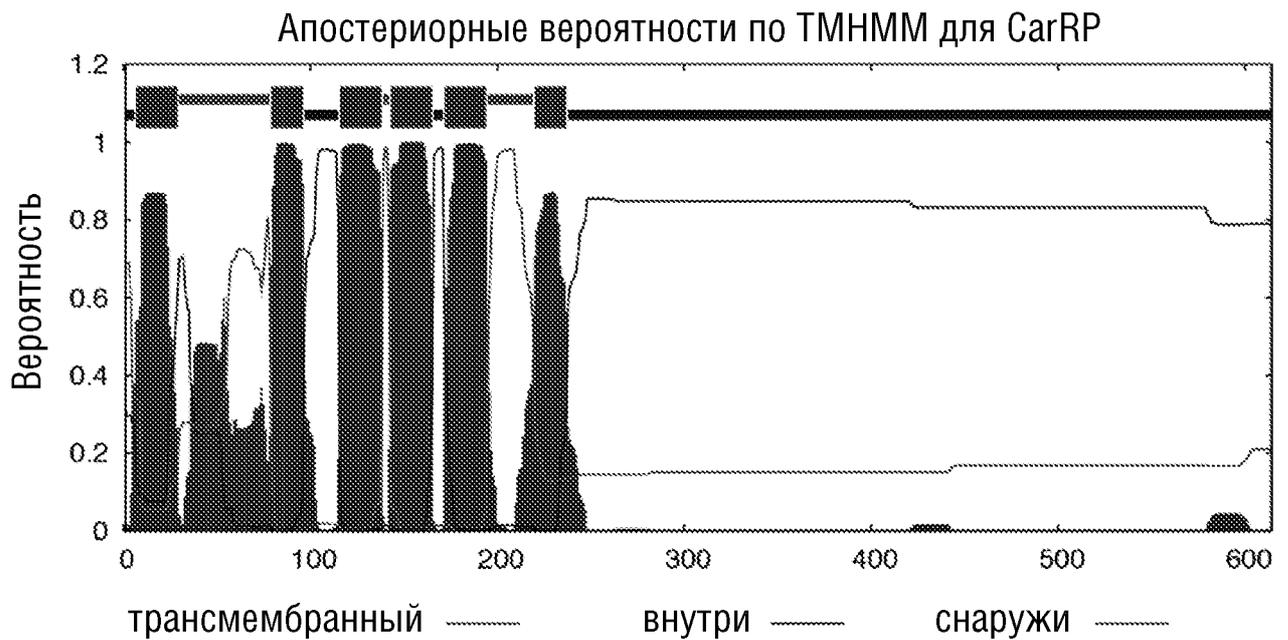
ФИГ.11



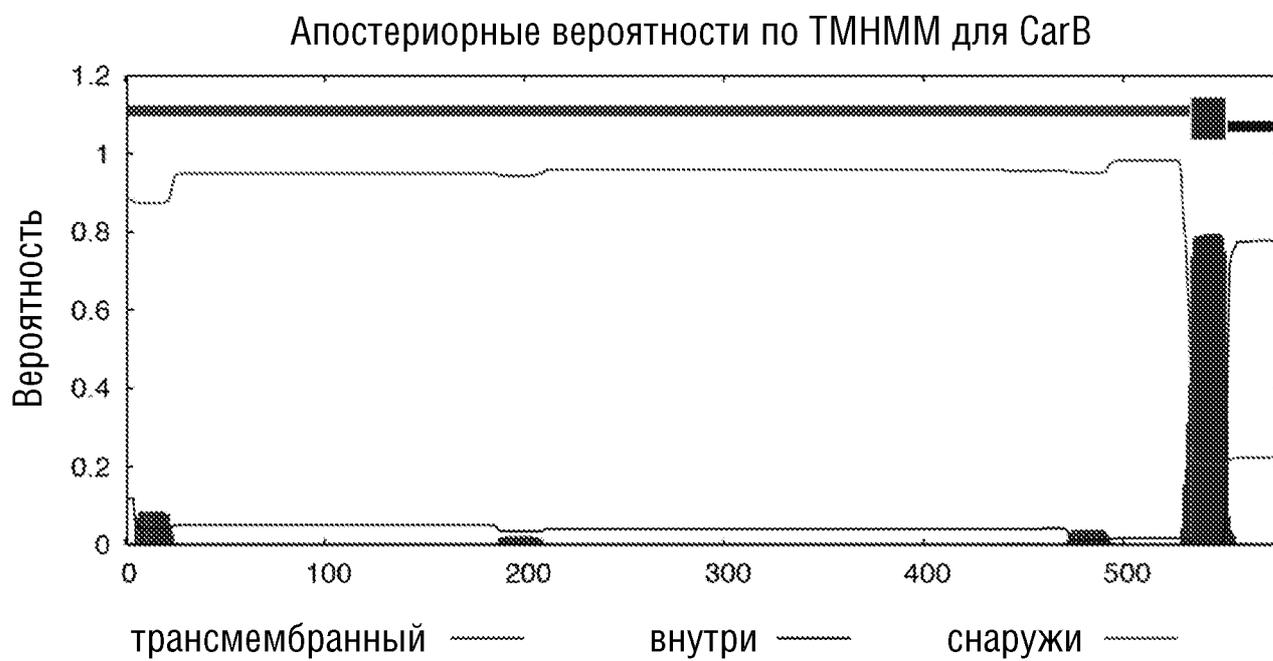
ФИГ.12А



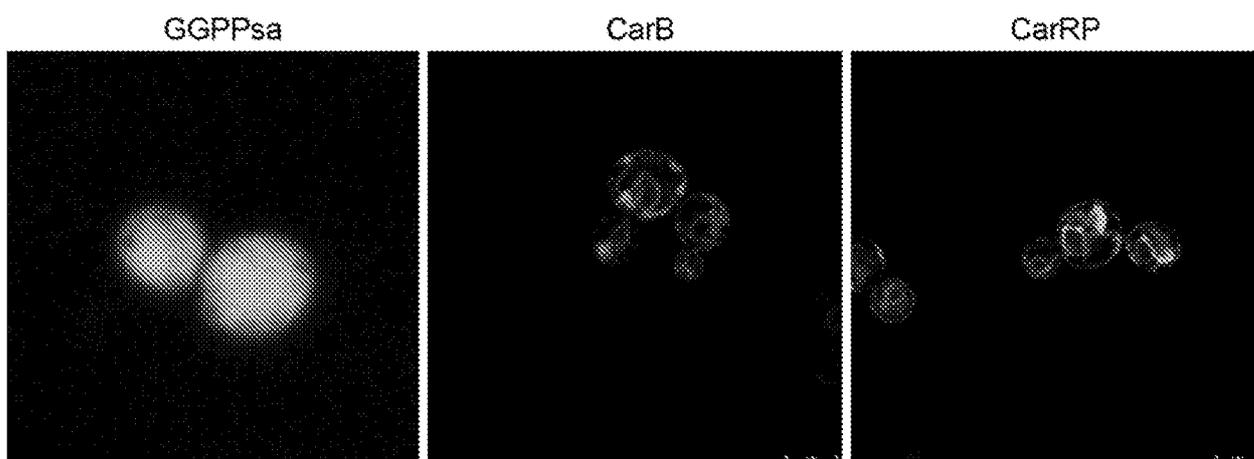
ФИГ.12В



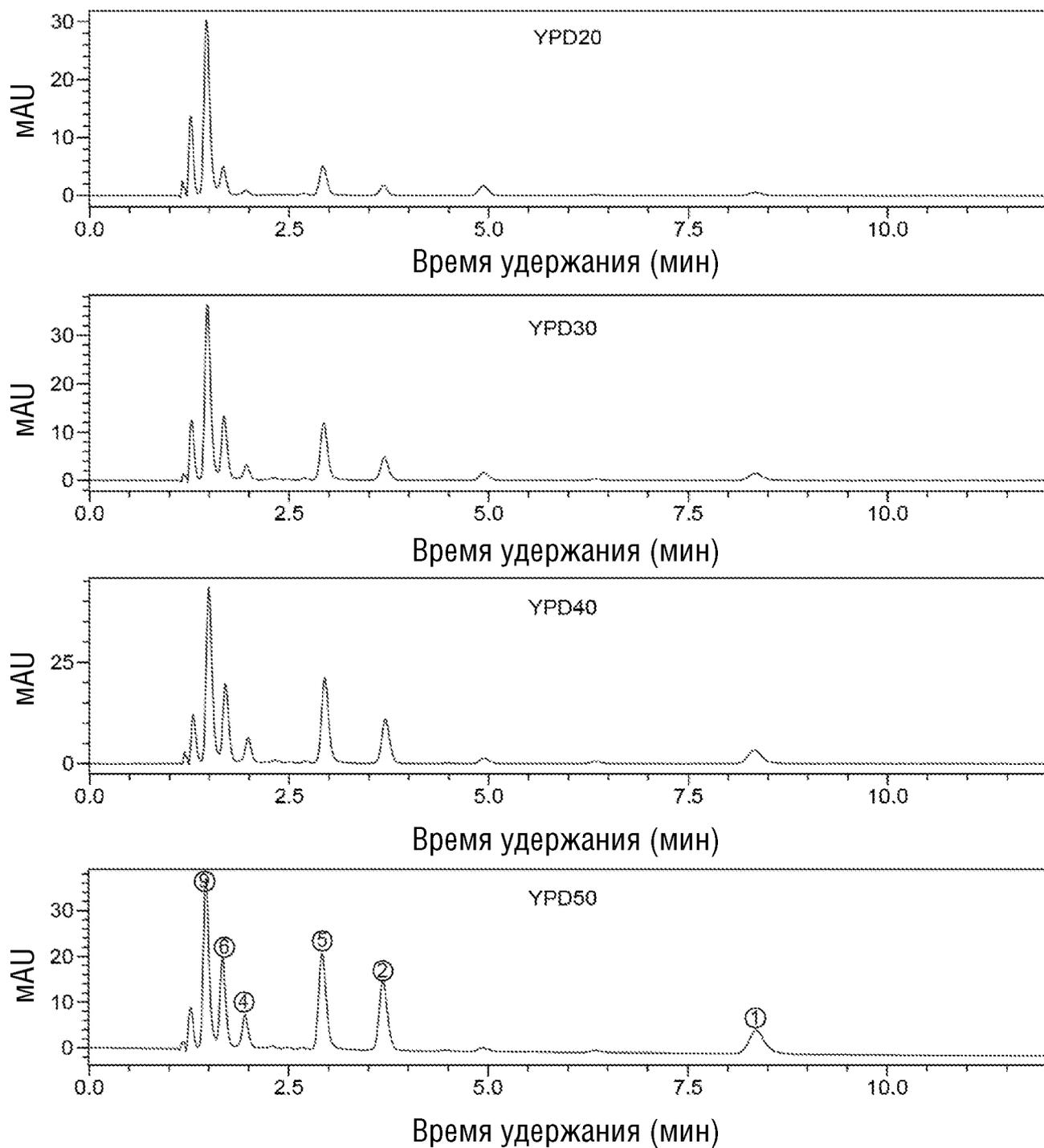
ФИГ.12С



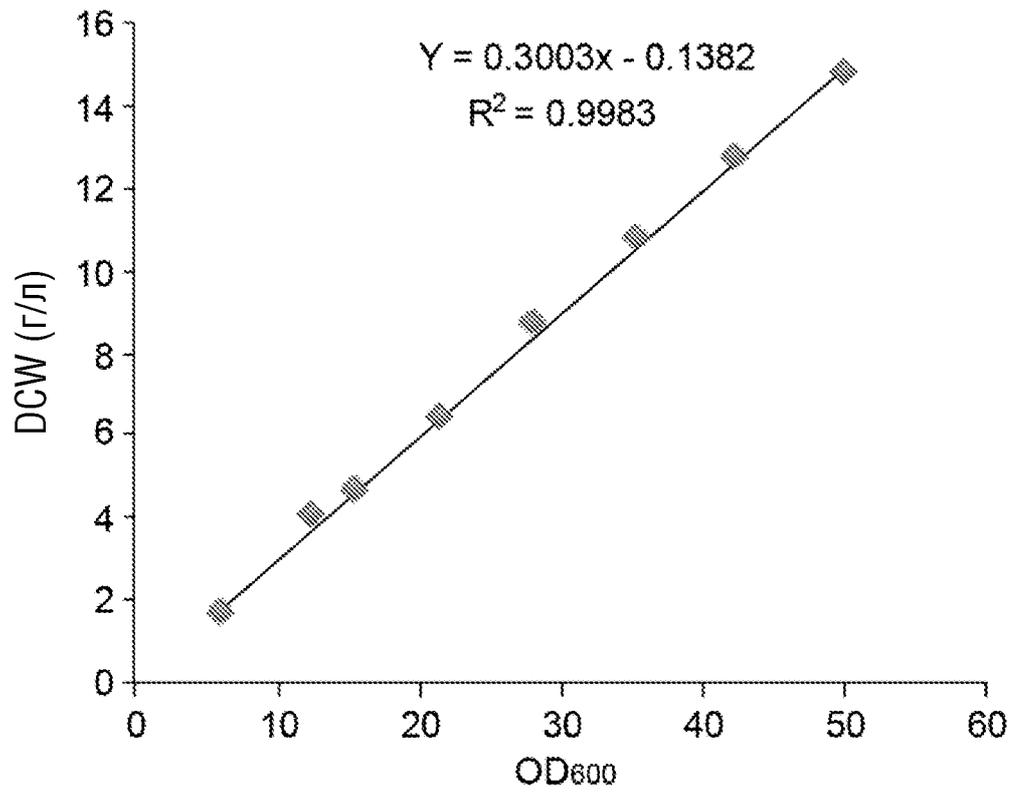
ФИГ.13



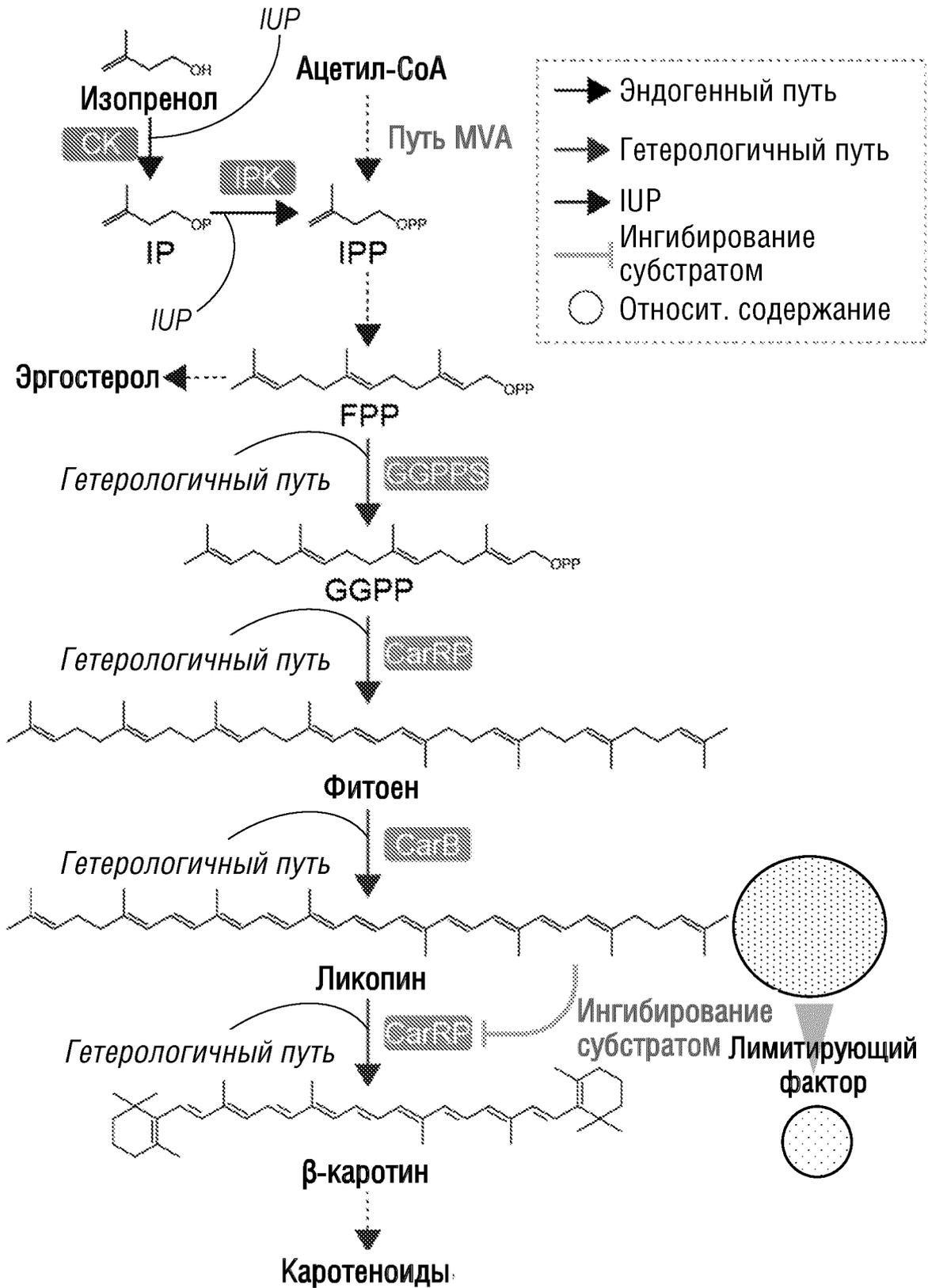
ФИГ.14



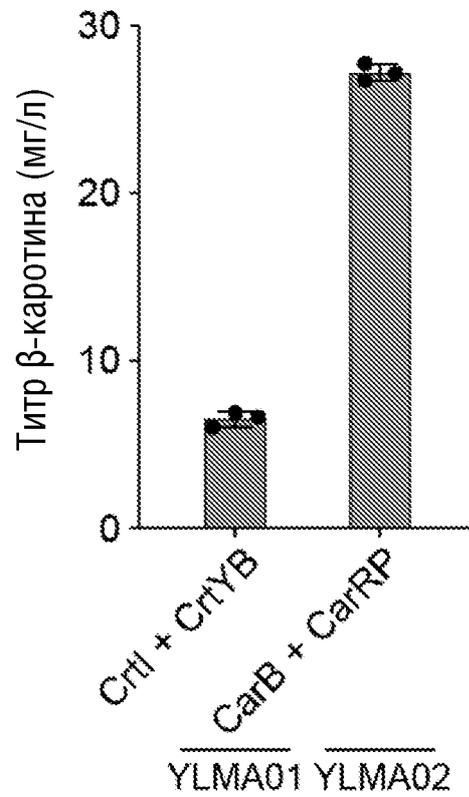
ФИГ.15



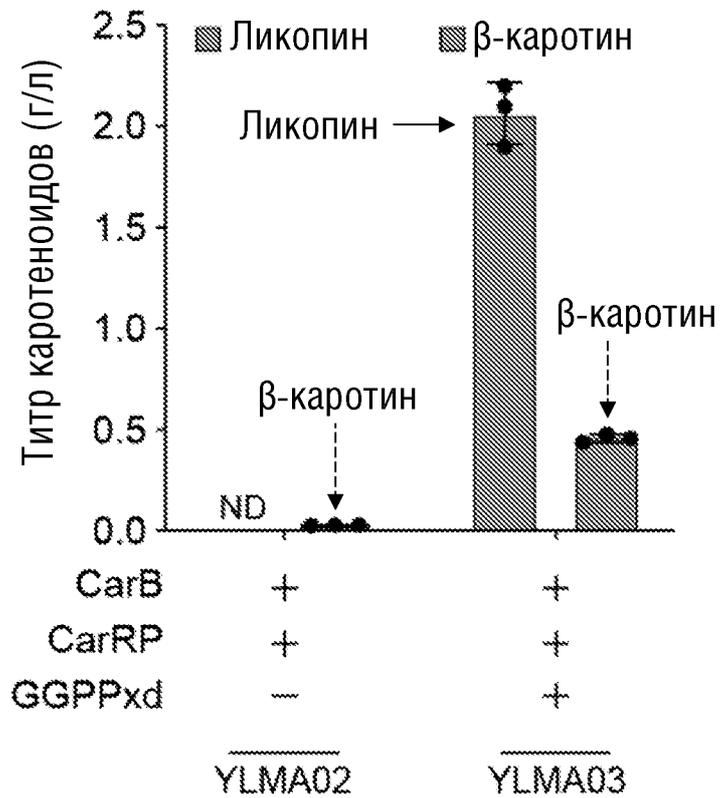
ФИГ.16А



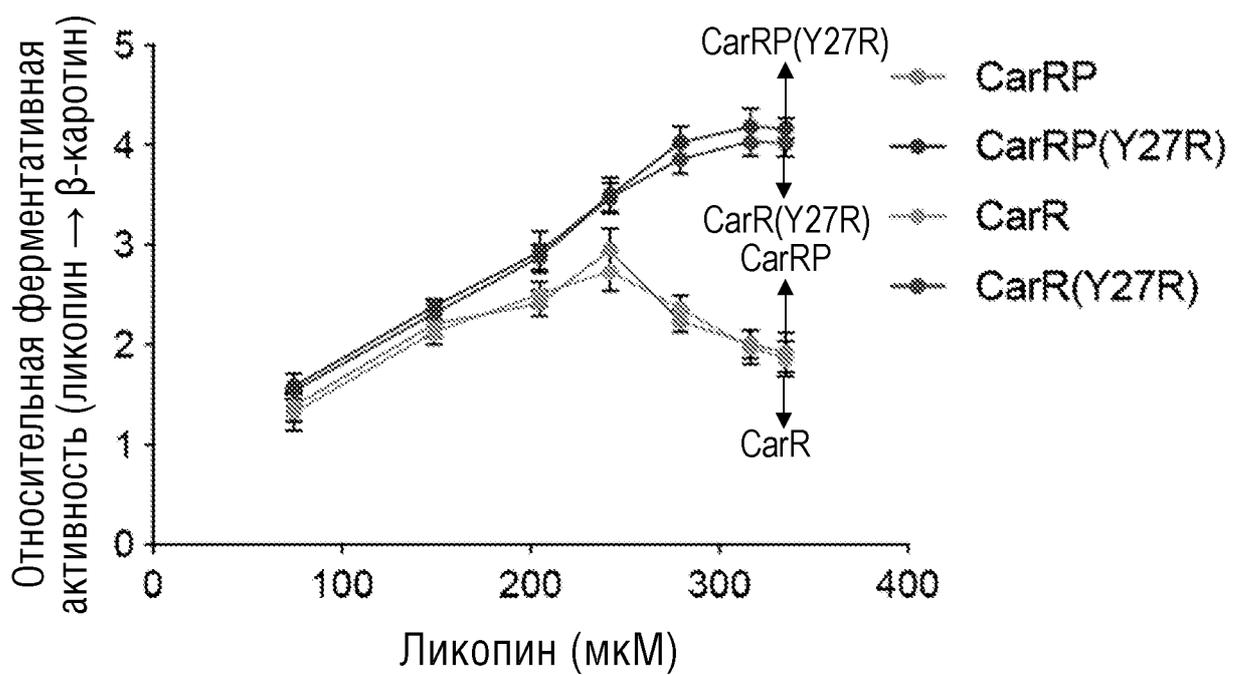
ФИГ.16В



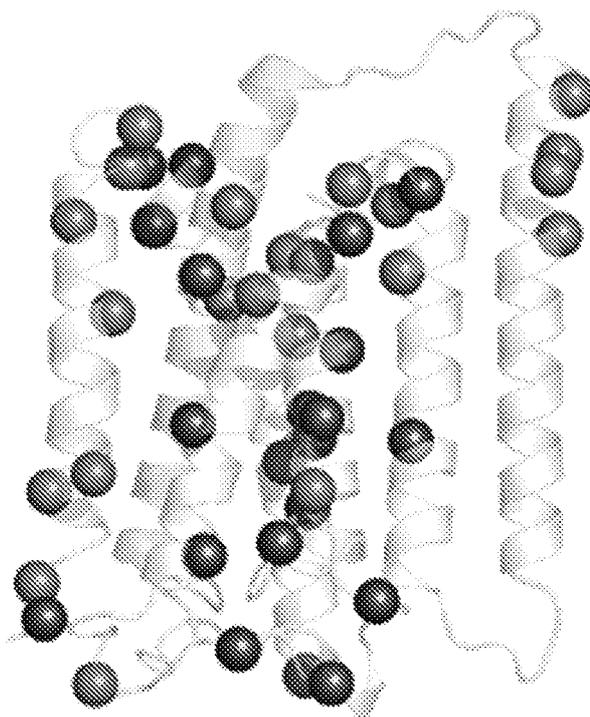
ФИГ.16С



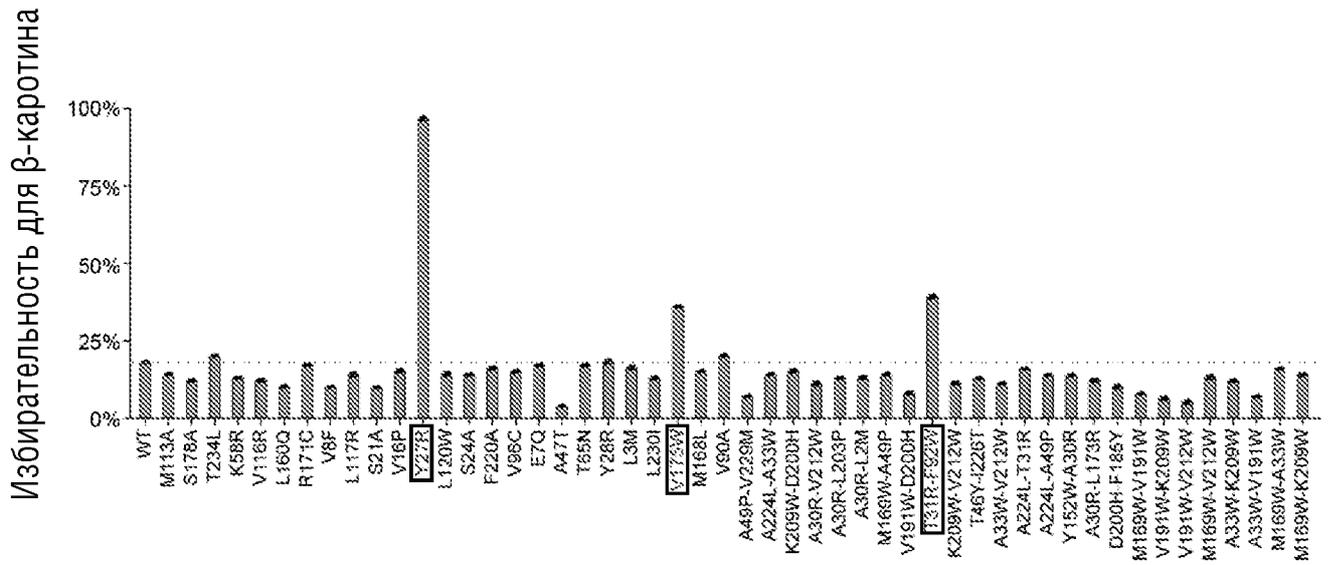
ФИГ.16D



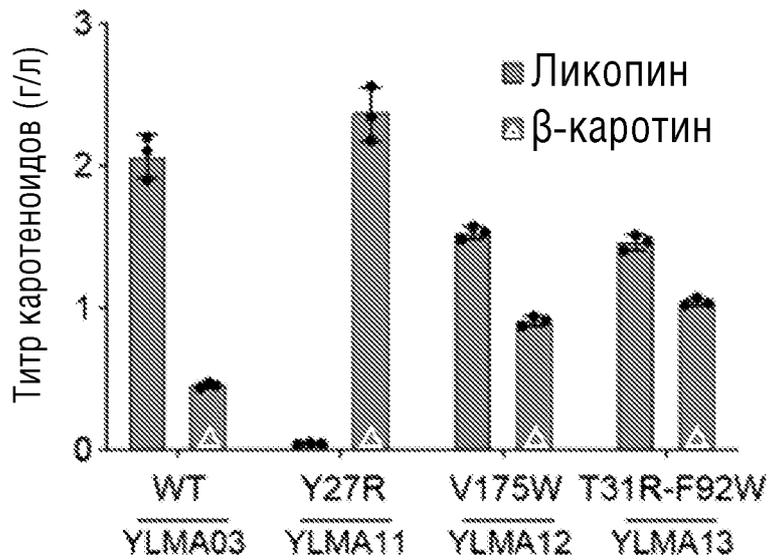
ФИГ.17A



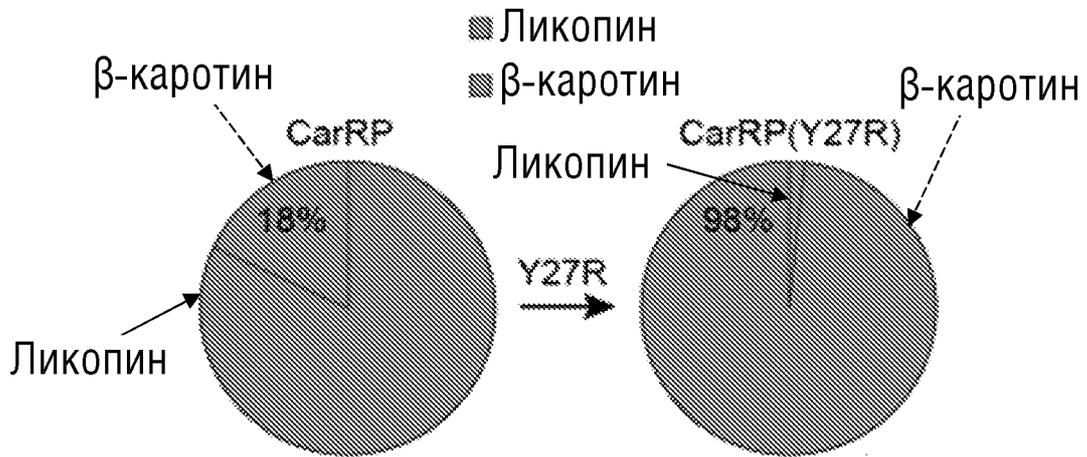
ФИГ.17В



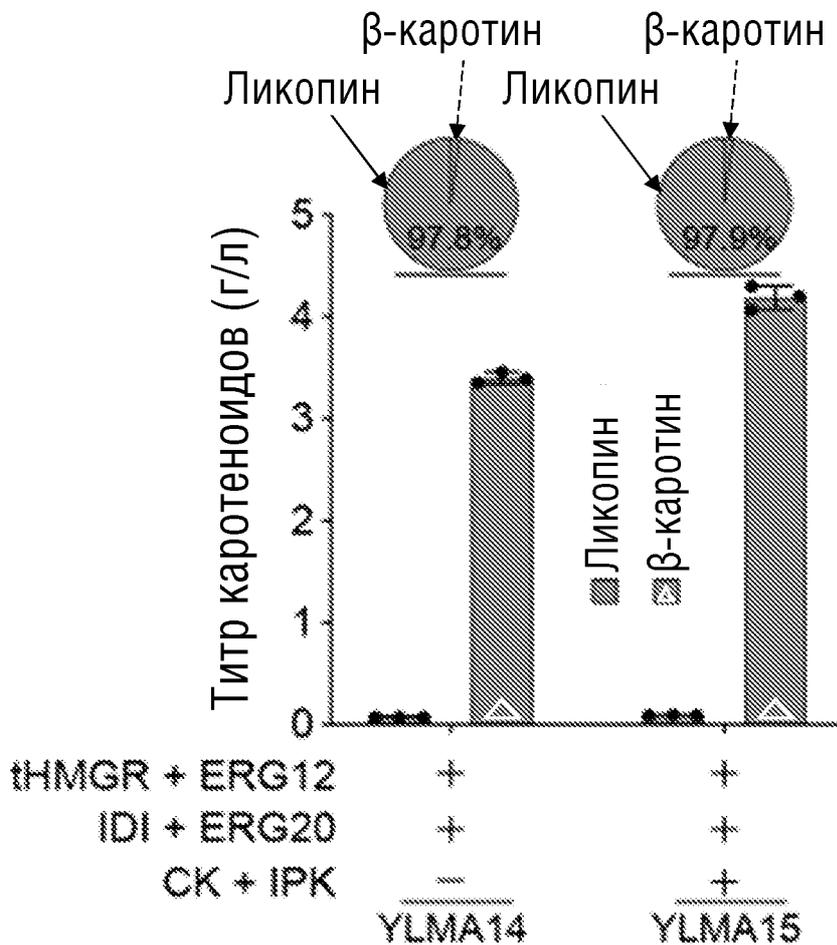
ФИГ.17С



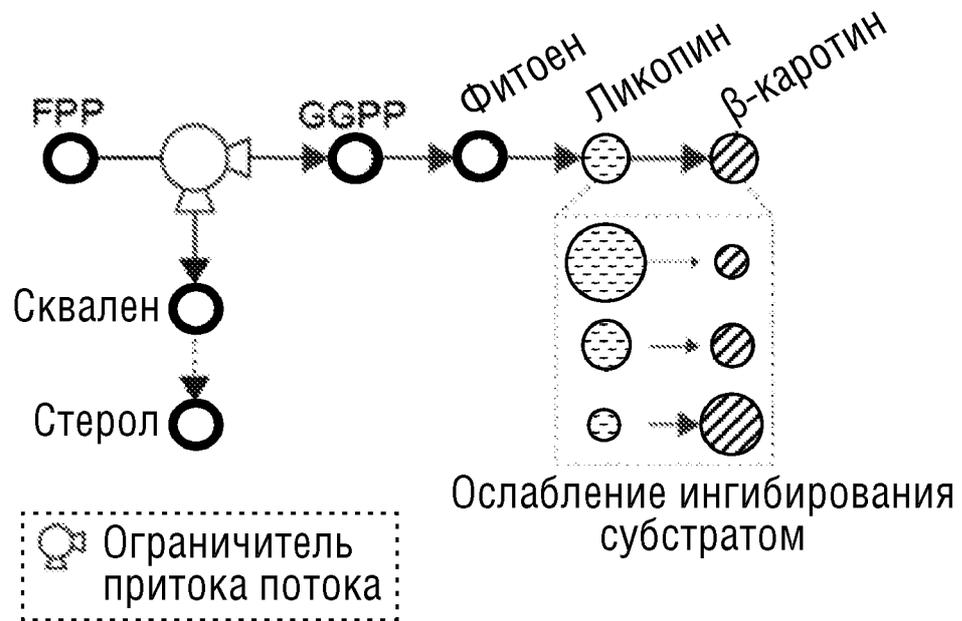
ФИГ.17D



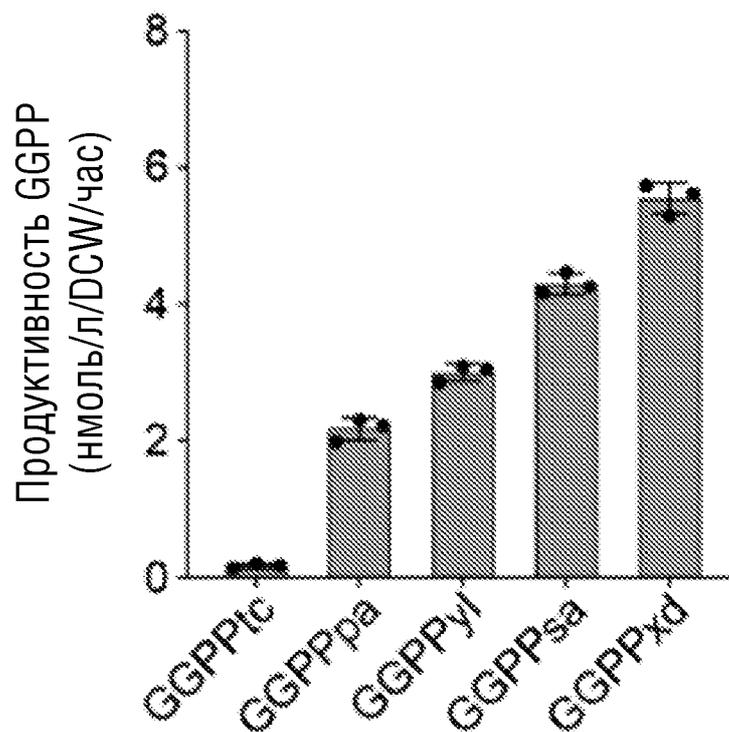
ФИГ.17E



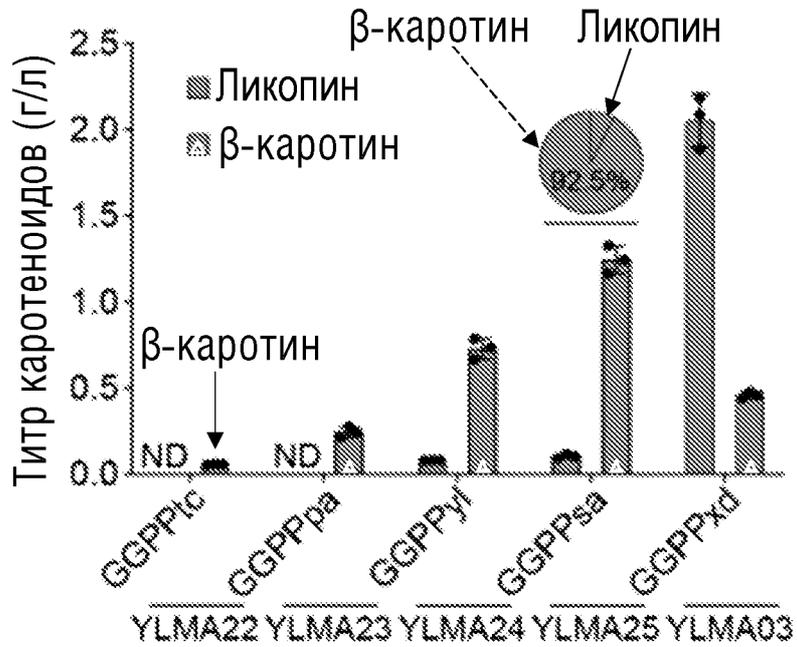
ФИГ.18А



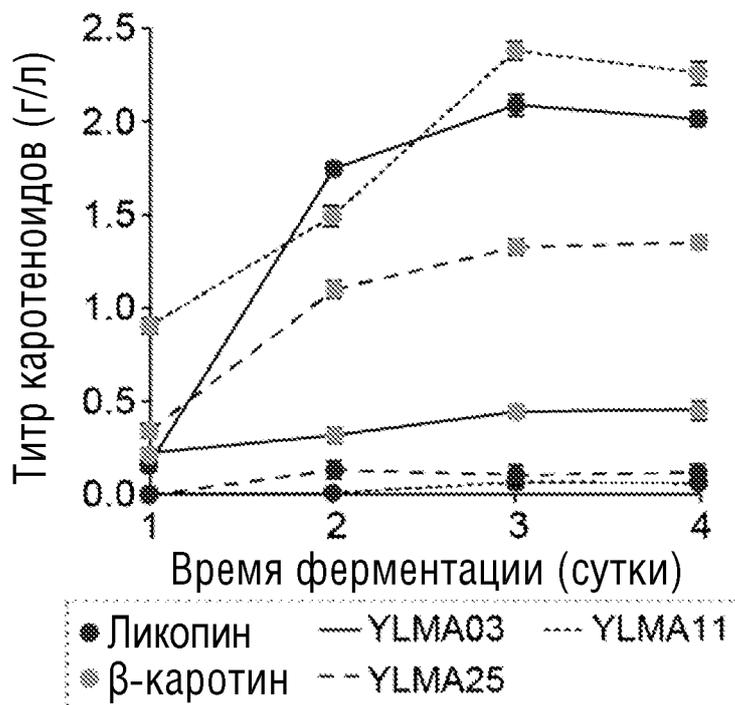
ФИГ.18В



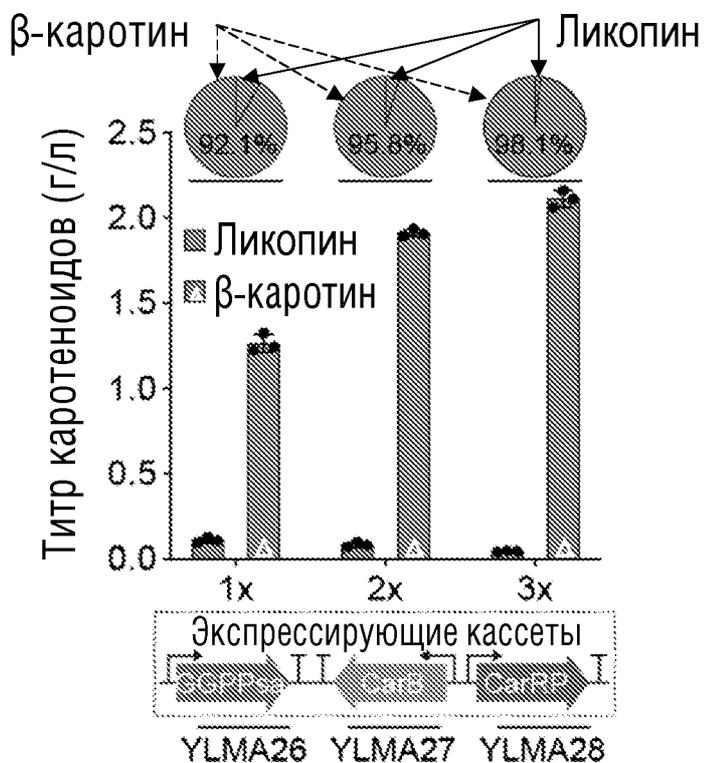
ФИГ.18С



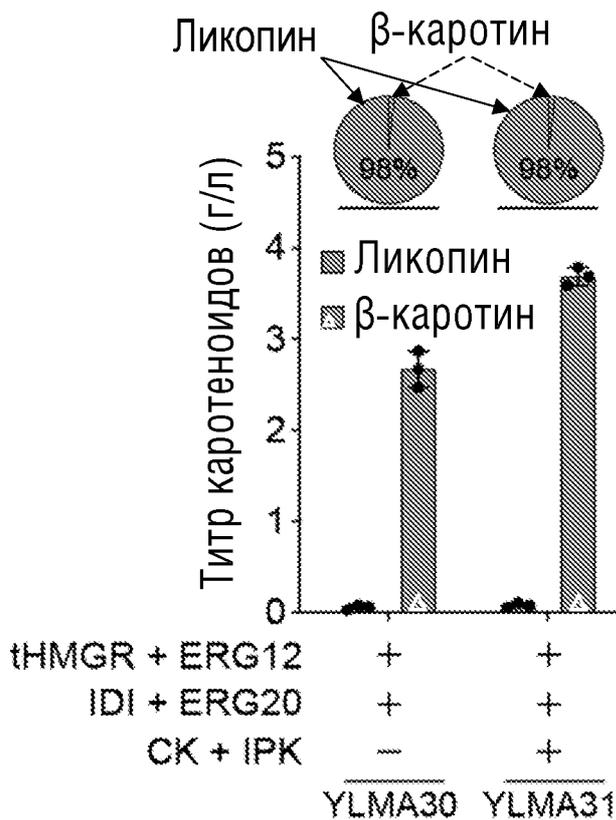
ФИГ.18D



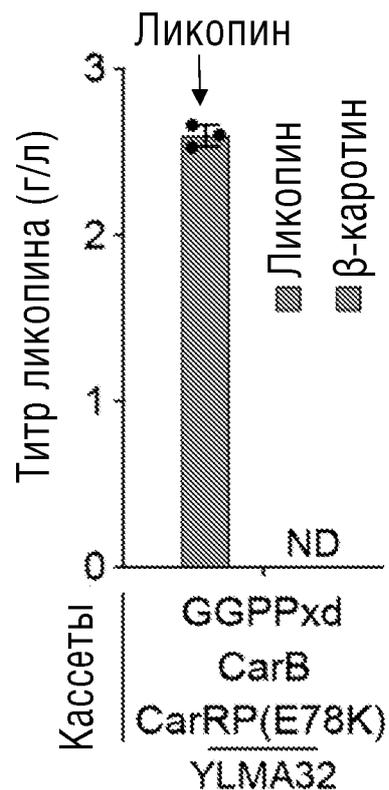
ФИГ.18Е



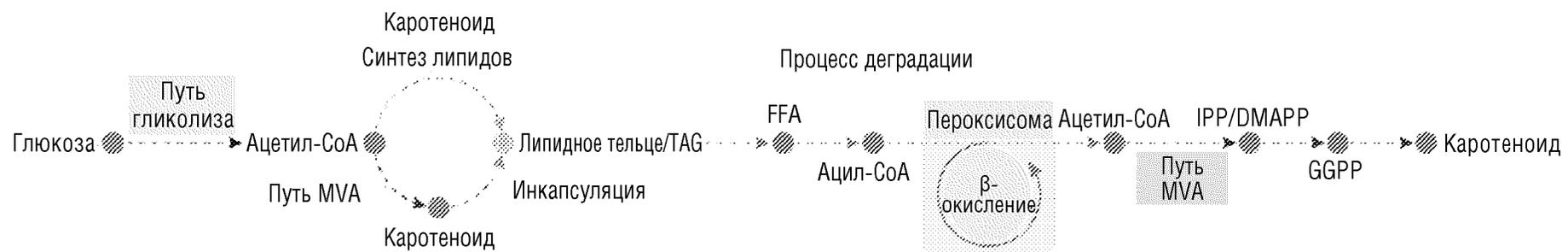
ФИГ.18F



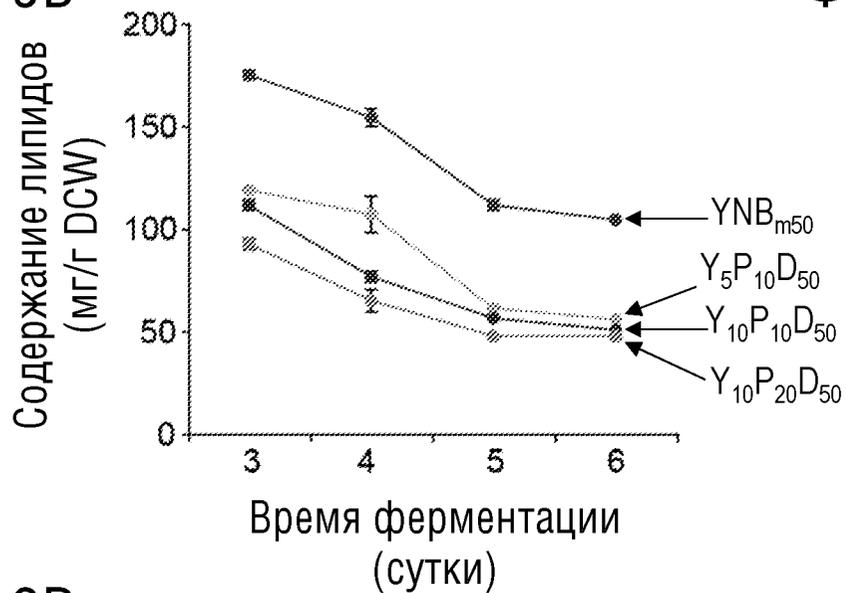
ФИГ.18G



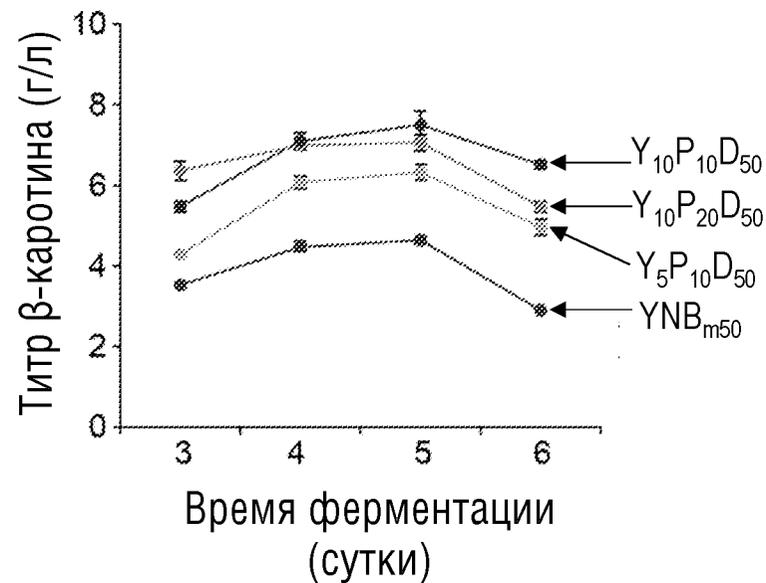
ФИГ.19А



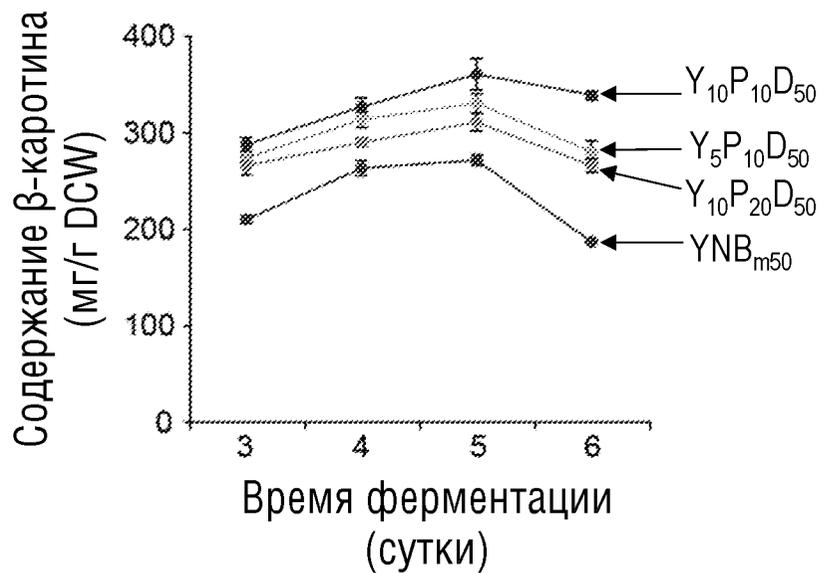
ФИГ.19В



ФИГ.19С

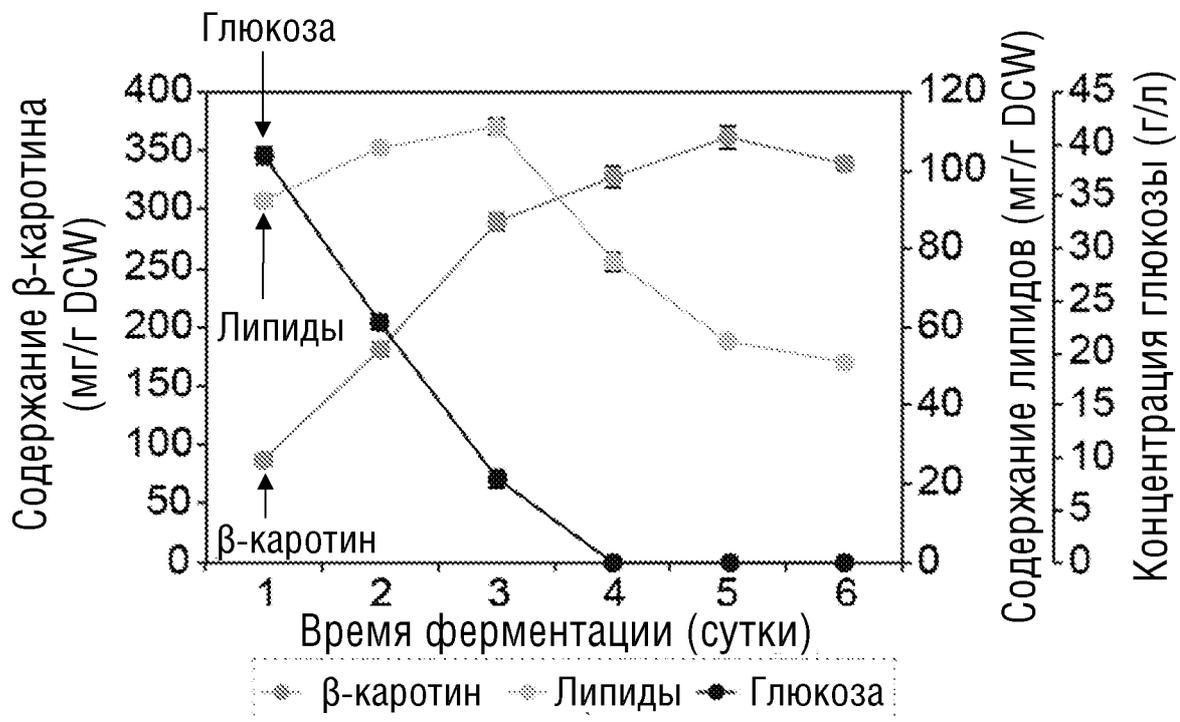


ФИГ.19D

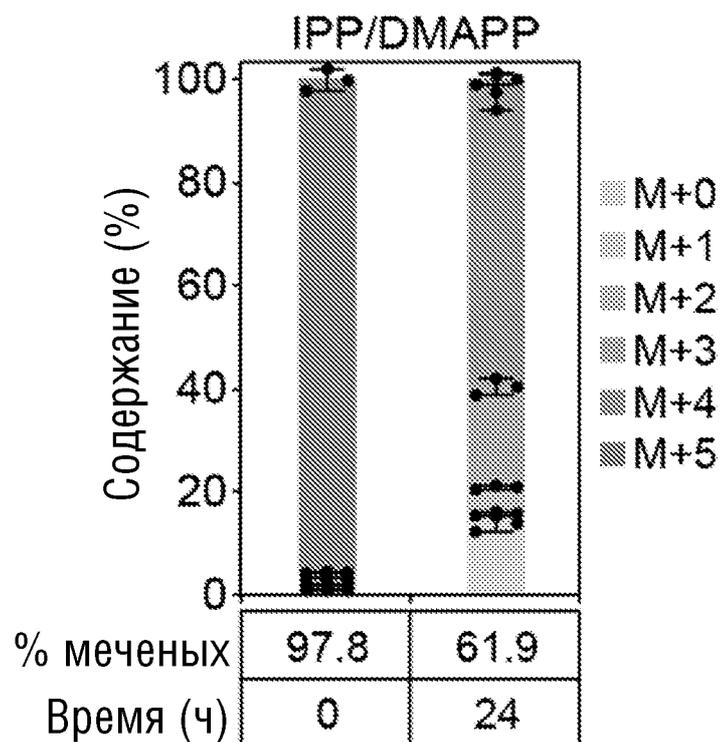


Соотношение	
Среды	C/N
Y ₁₀ P ₂₀ D ₅₀	7 : 1
Y ₁₀ P ₁₀ D ₅₀	9 : 1
Y ₅ P ₁₀ D ₅₀	11 : 1
YNB _{m50}	43 : 1

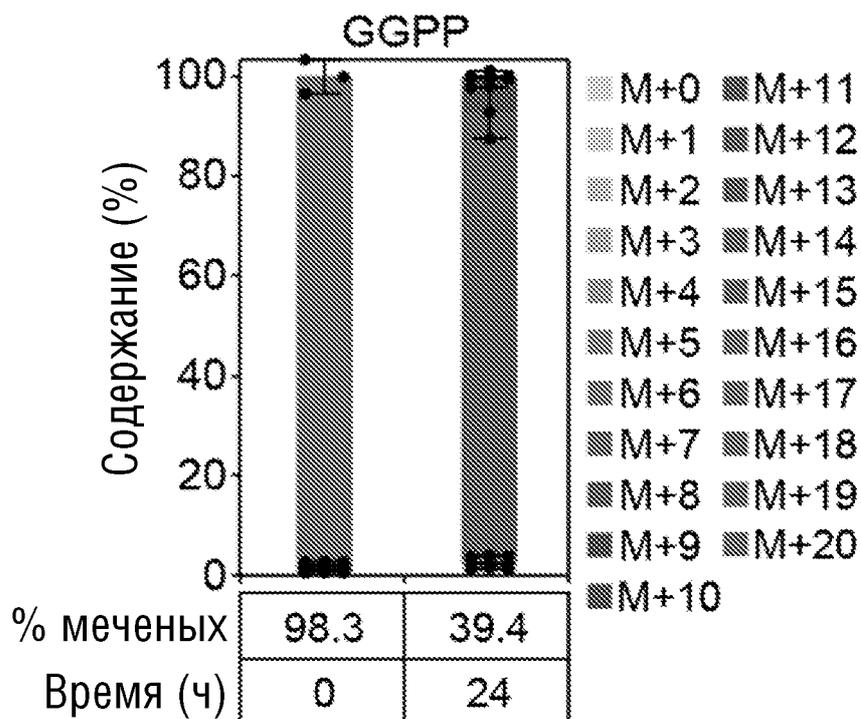
ФИГ.20А



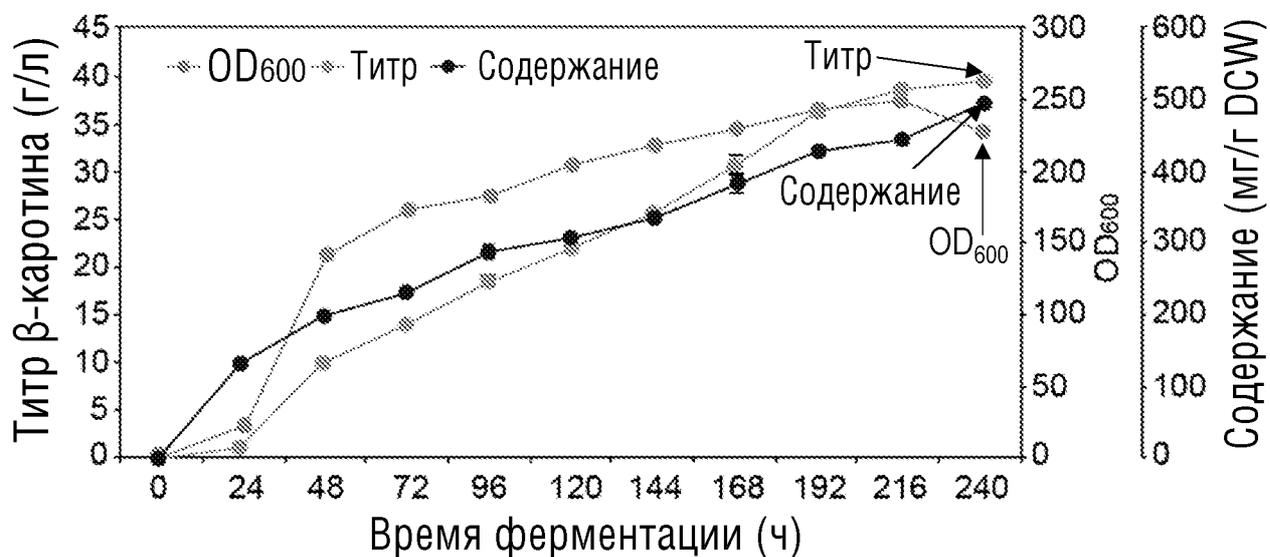
ФИГ.20В



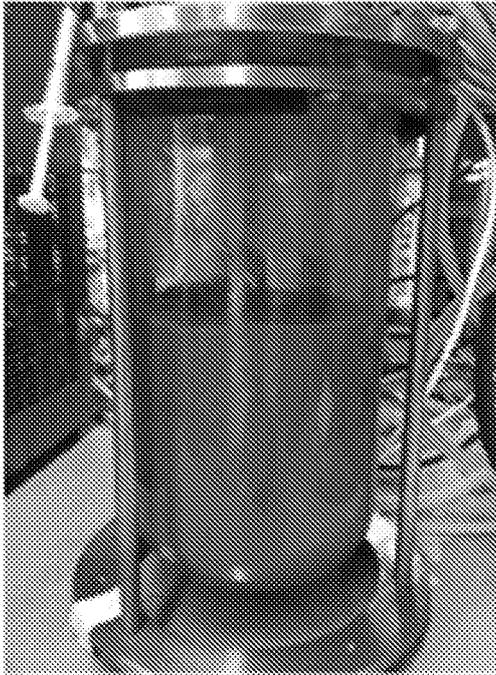
ФИГ.20С



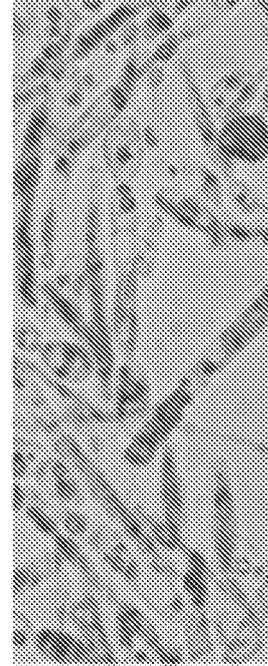
ФИГ.21А



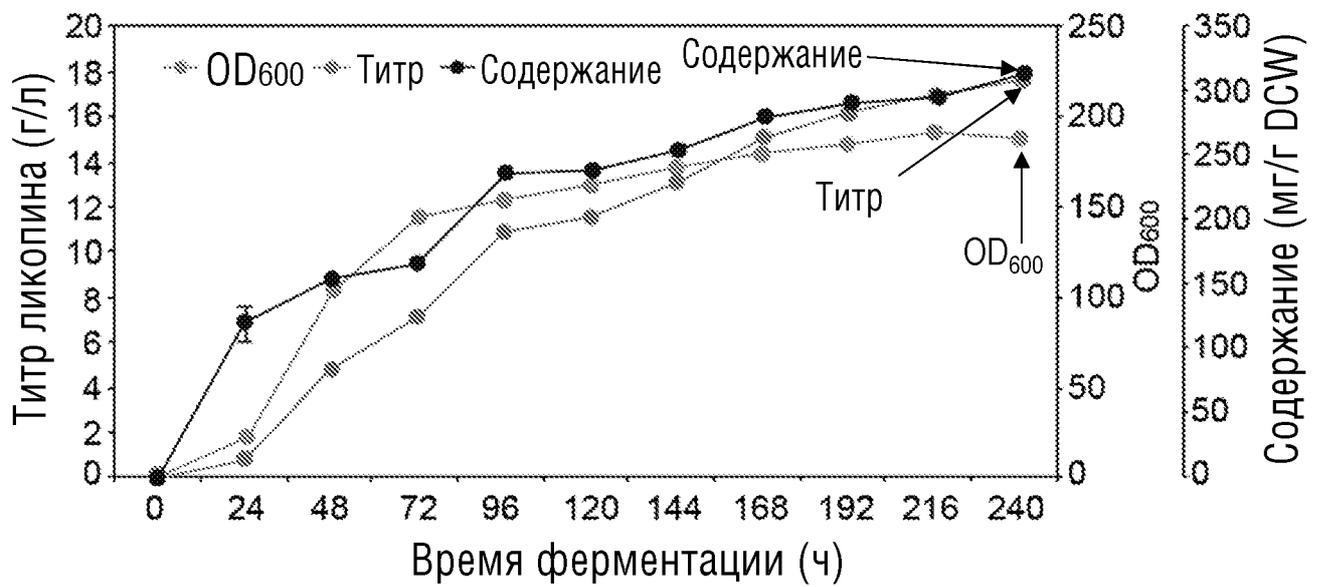
ФИГ.21В



ФИГ.21С



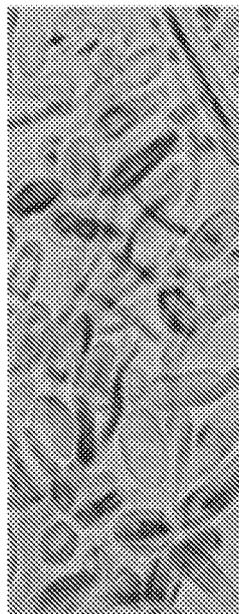
ФИГ.21D



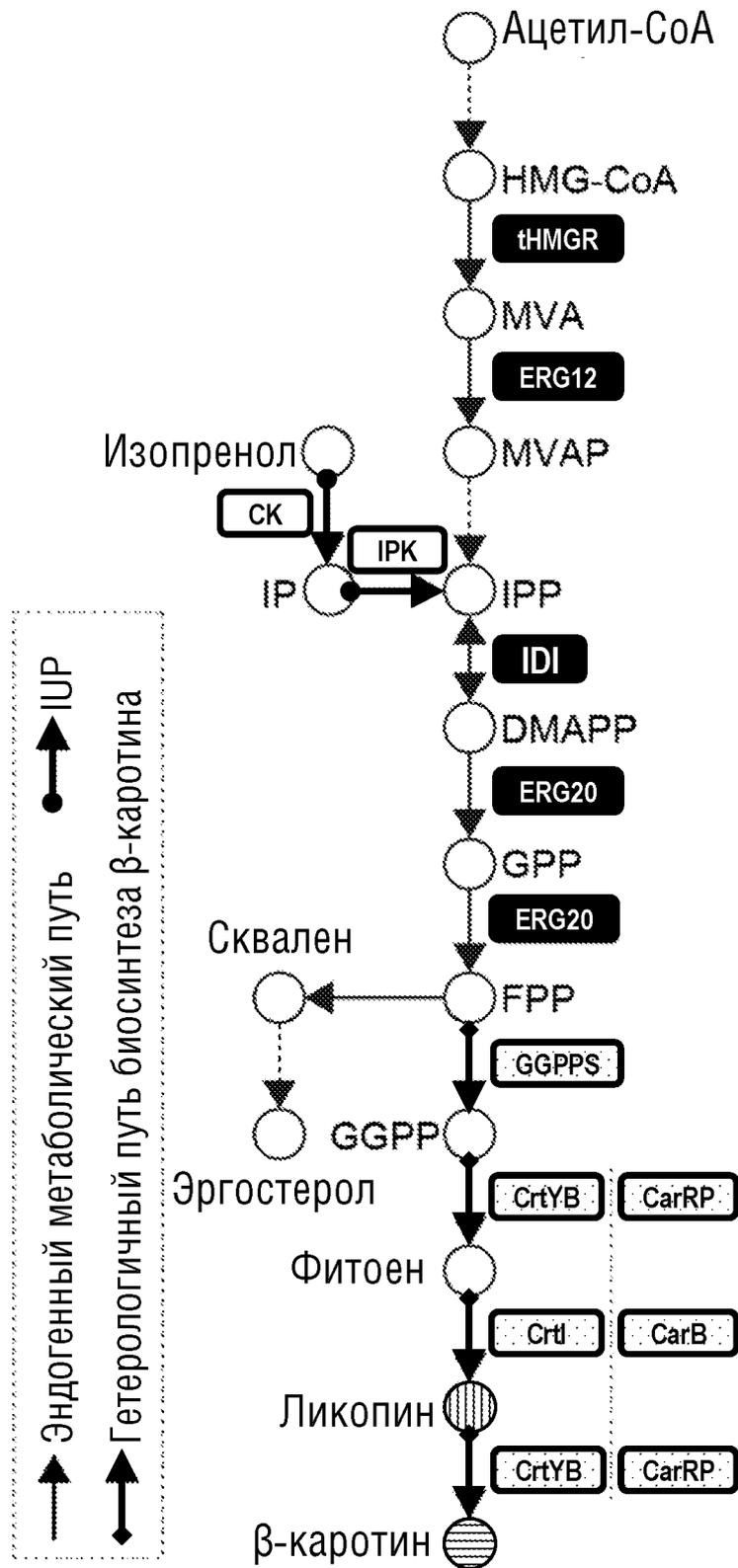
ФИГ.21Е



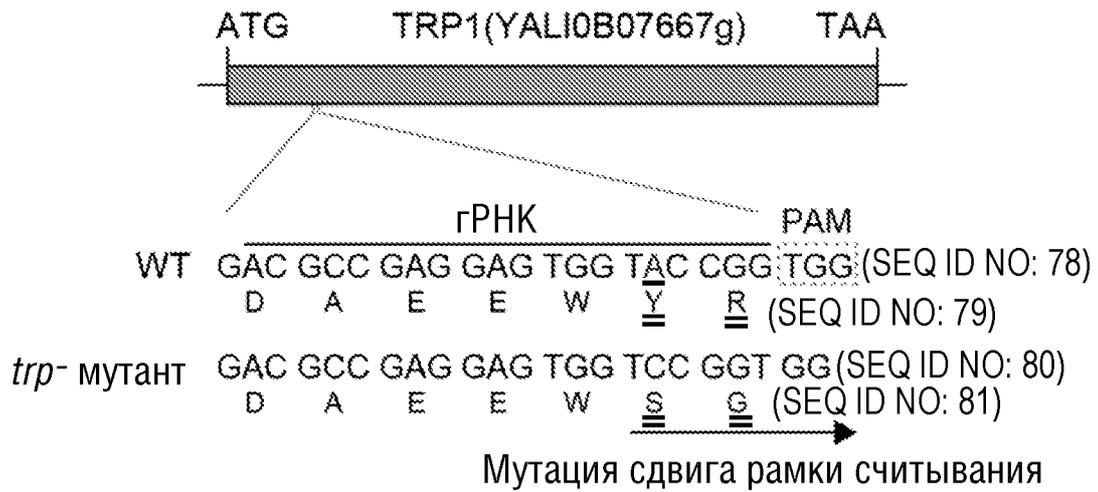
ФИГ.21F



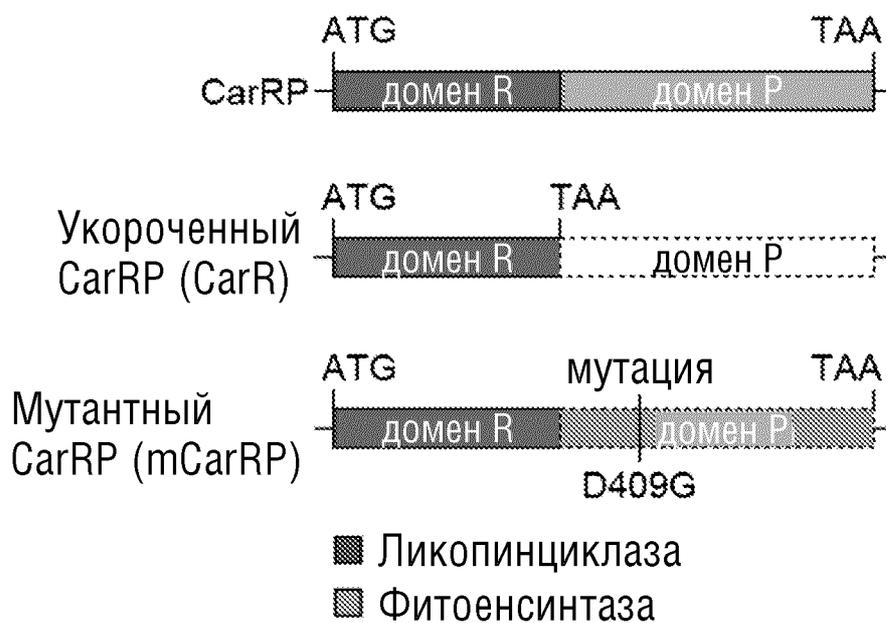
ФИГ.22



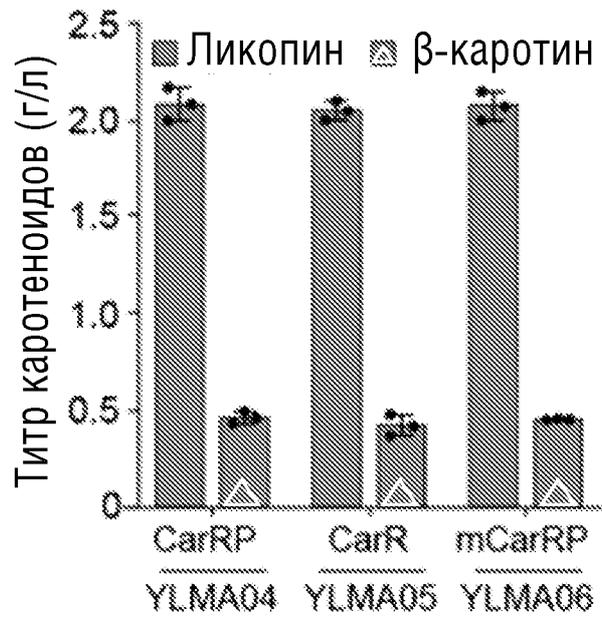
ФИГ.23



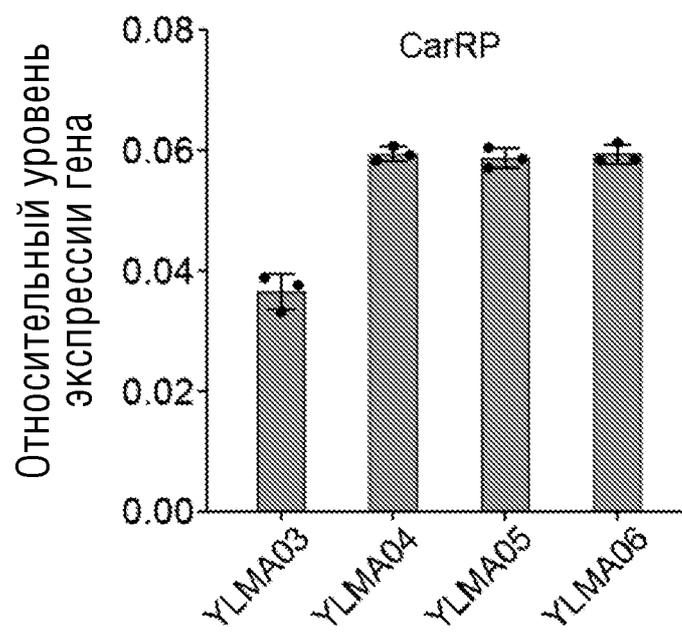
ФИГ.24А



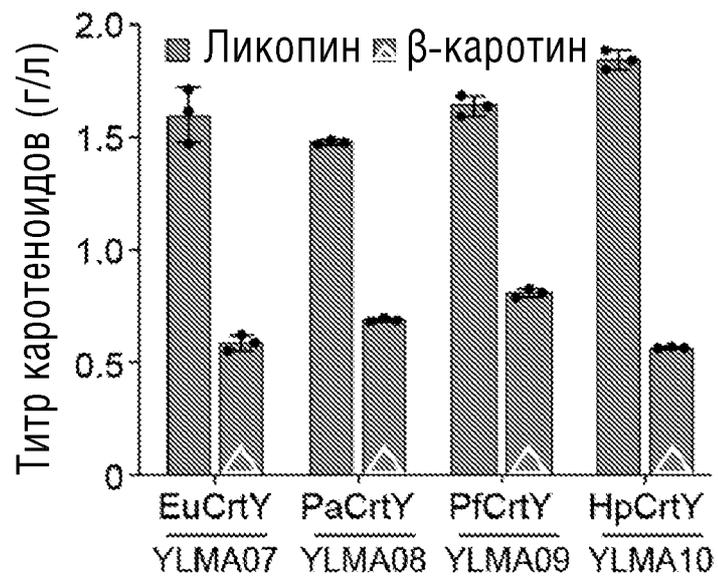
ФИГ.24В



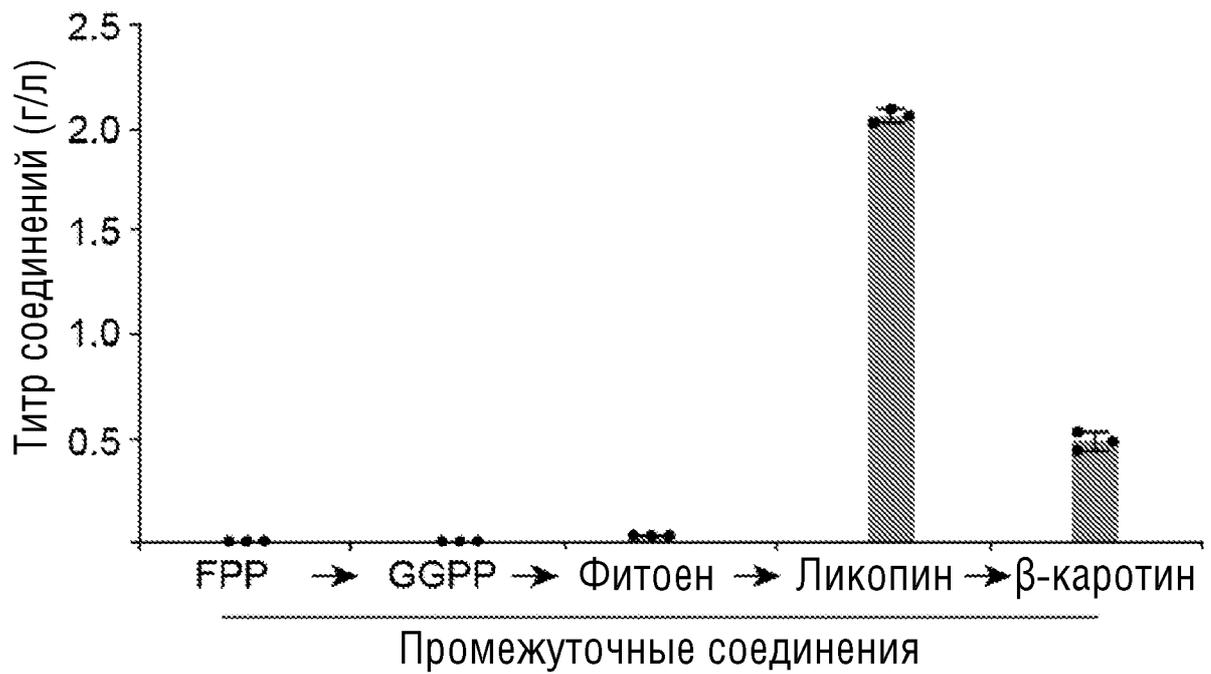
ФИГ.24С



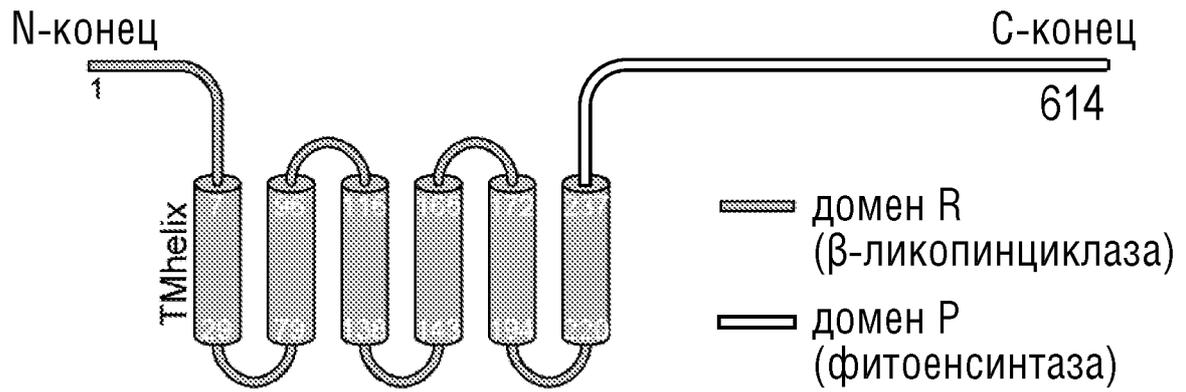
ФИГ.24D



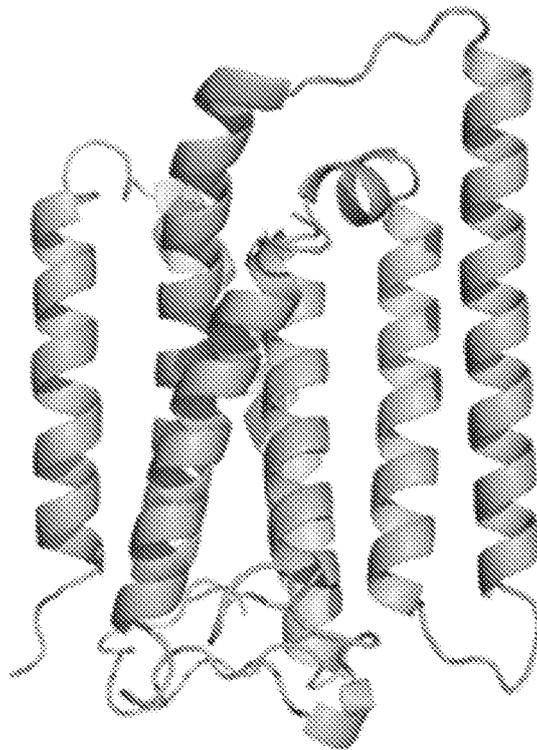
ФИГ.25



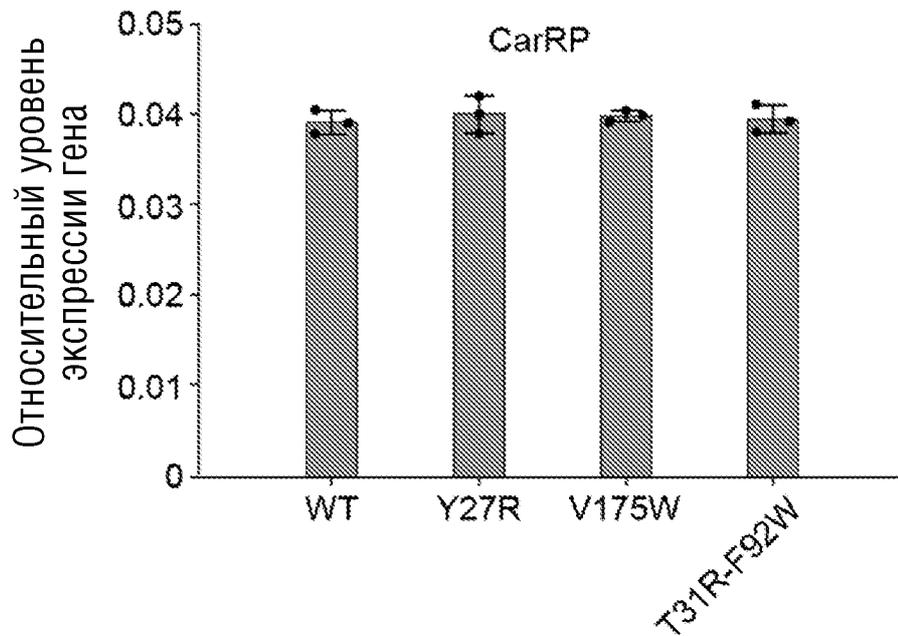
ФИГ.26



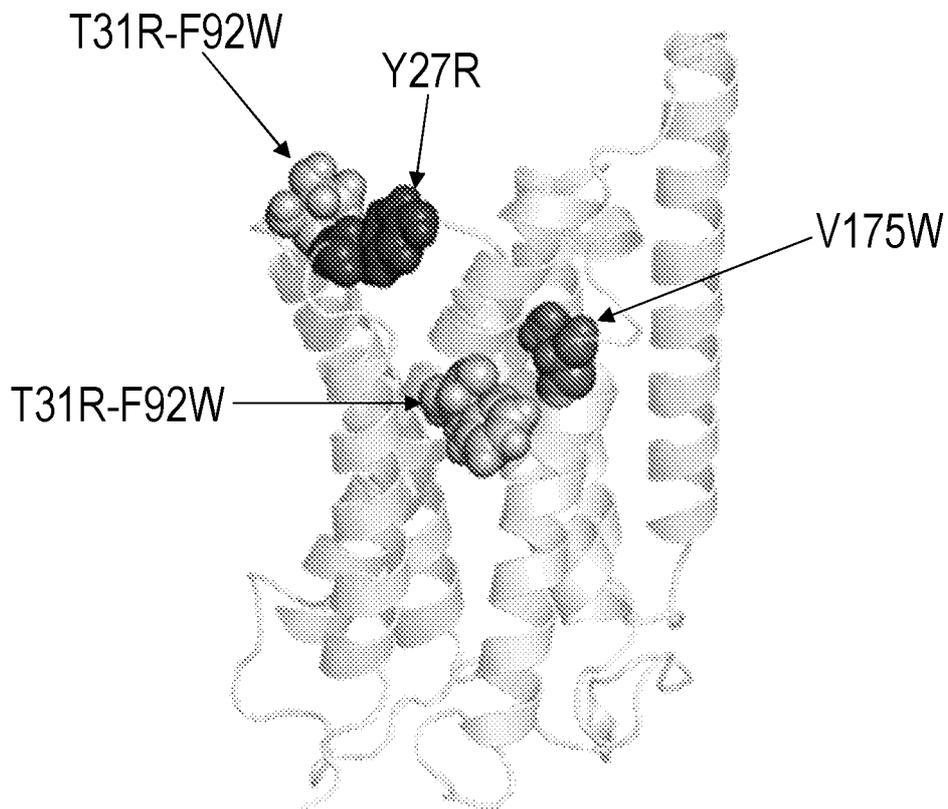
ФИГ.27



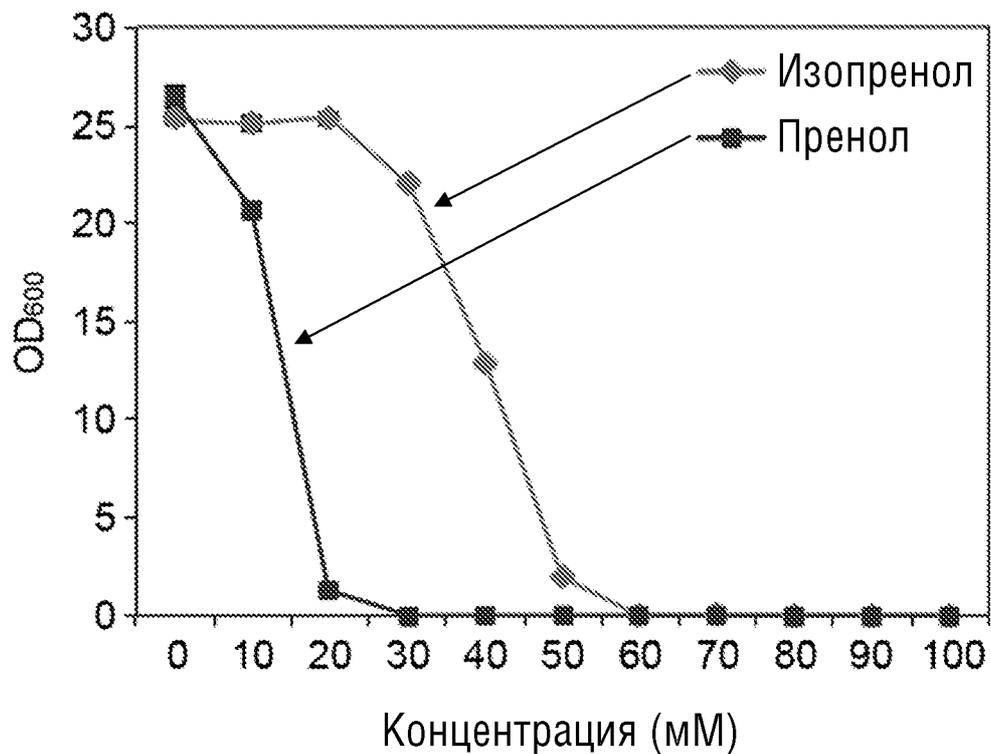
ФИГ.29



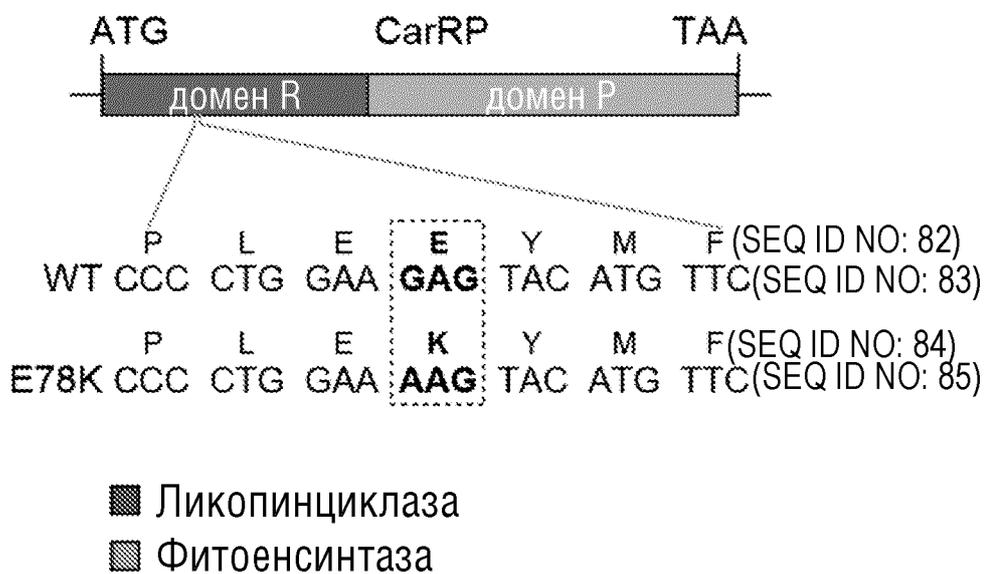
ФИГ.30



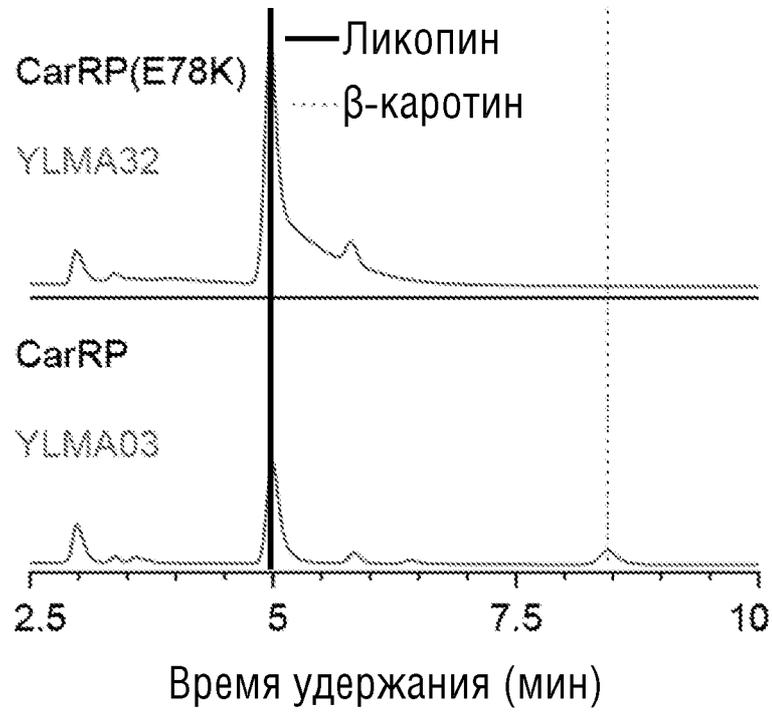
ФИГ.31



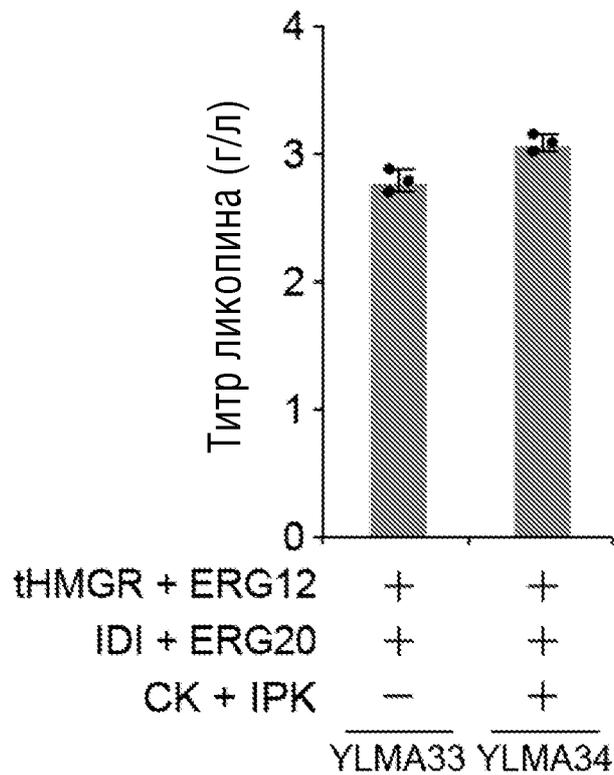
ФИГ.32А



ФИГ.32В



ФИГ.33

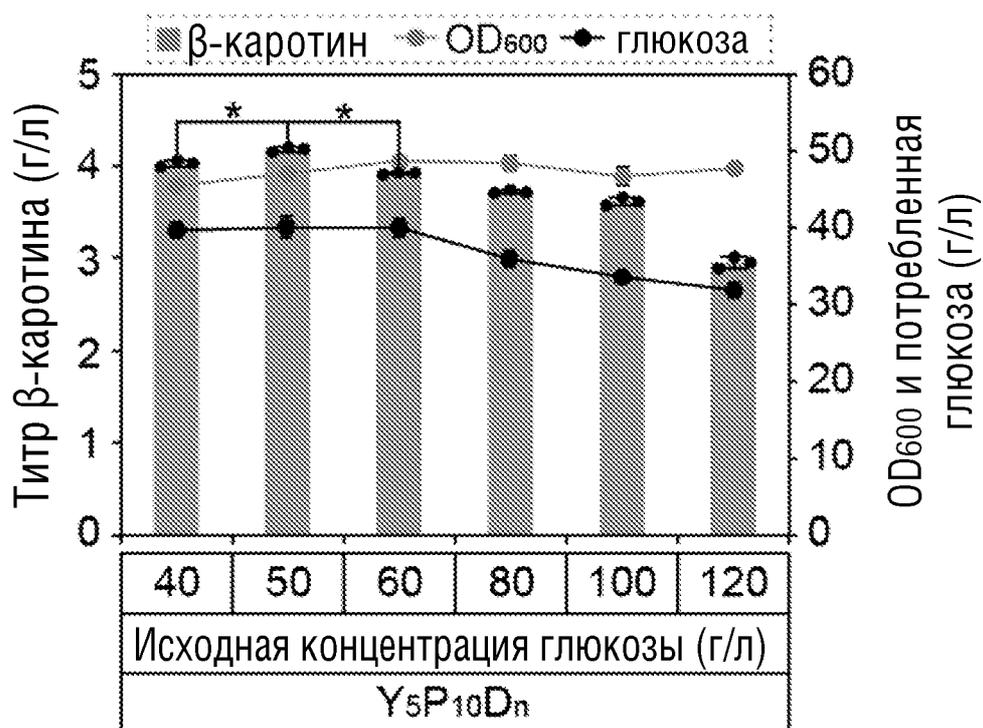


ФИГ.34

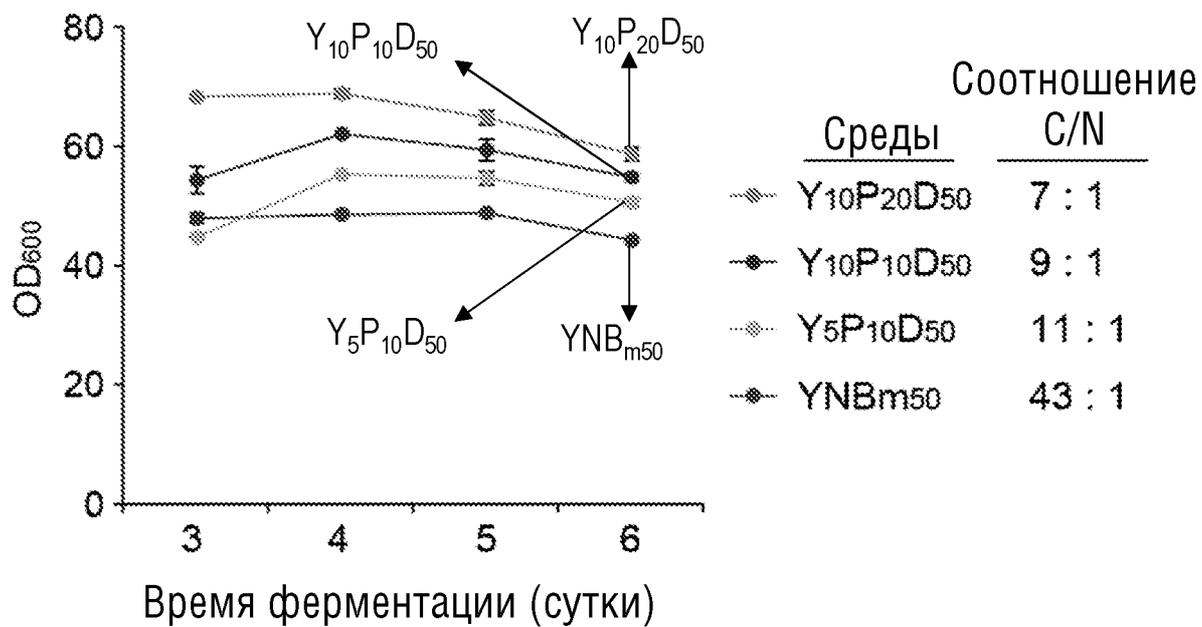
	Дрожжевой экстракт (г/л)	Пептон (г/л)	Глюкоза (г/л)	Соотношение C/N
Y ₁₀ P ₂₀ D ₅₀	10	20	50	7 : 1
Y ₁₀ P ₁₀ D ₅₀	10	10	50	9 : 1
Y ₅ P ₁₀ D ₅₀	5	10	50	11 : 1

	Дрожжевой экстракт (г/л)	YNB (г/л)	Глюкоза (г/л)	Соотношение C/N
YNB _{m50}	5	6.9	50	43 : 1

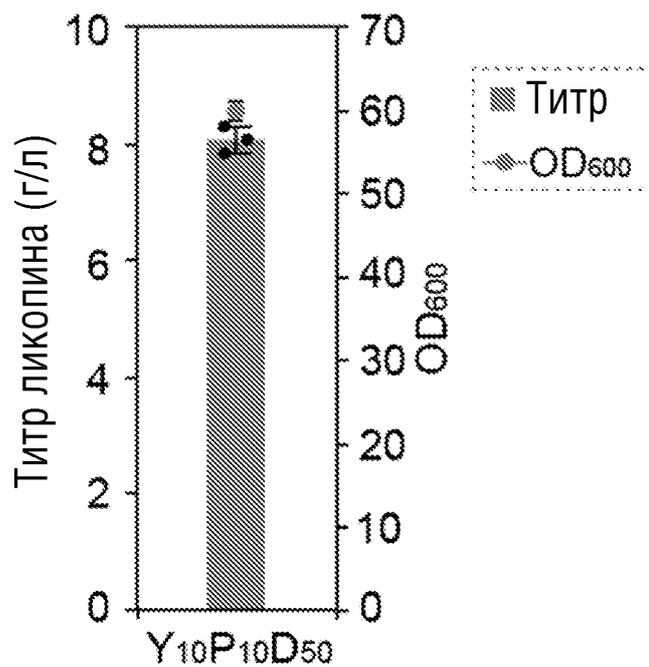
ФИГ.35



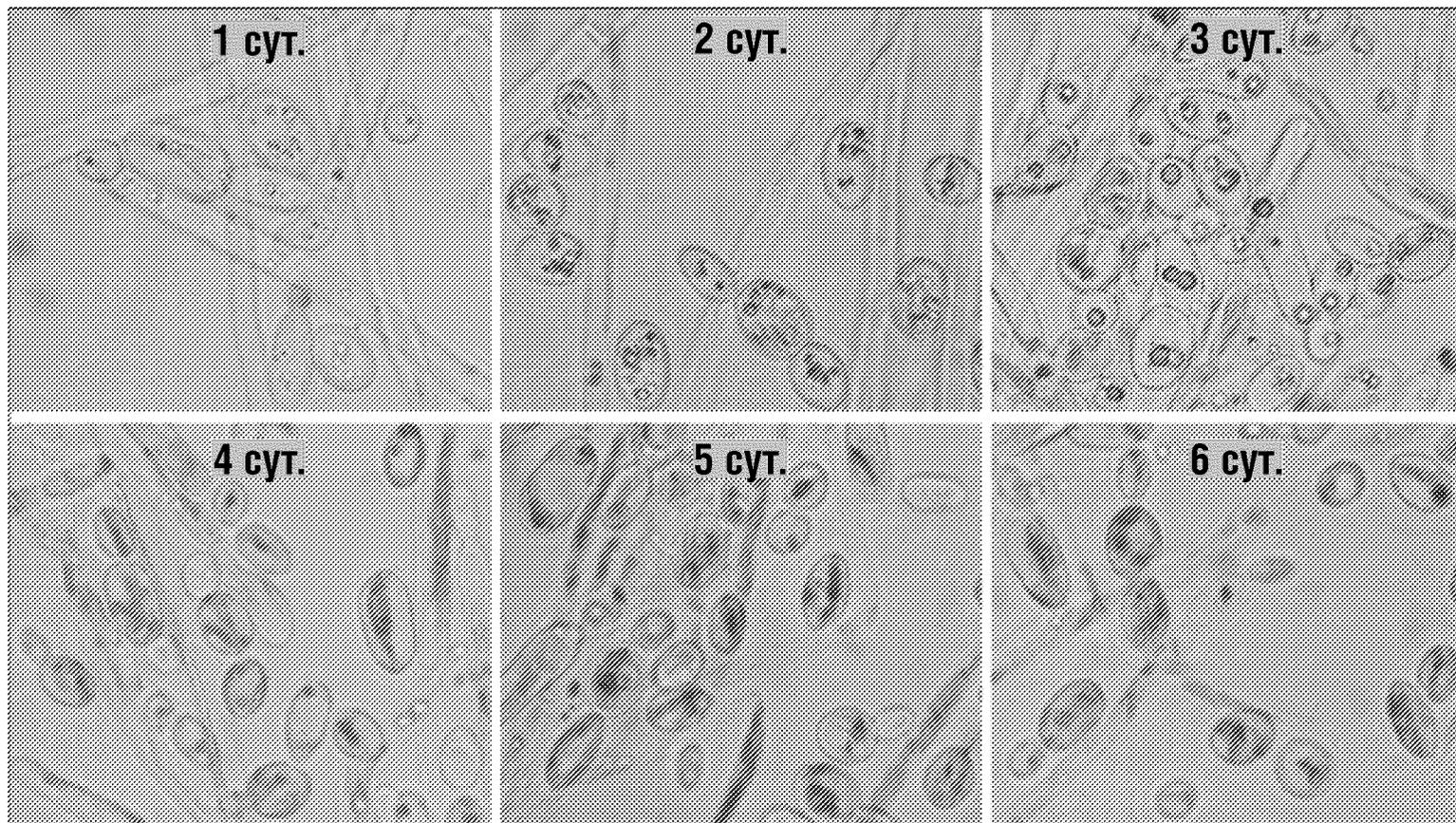
ФИГ.36



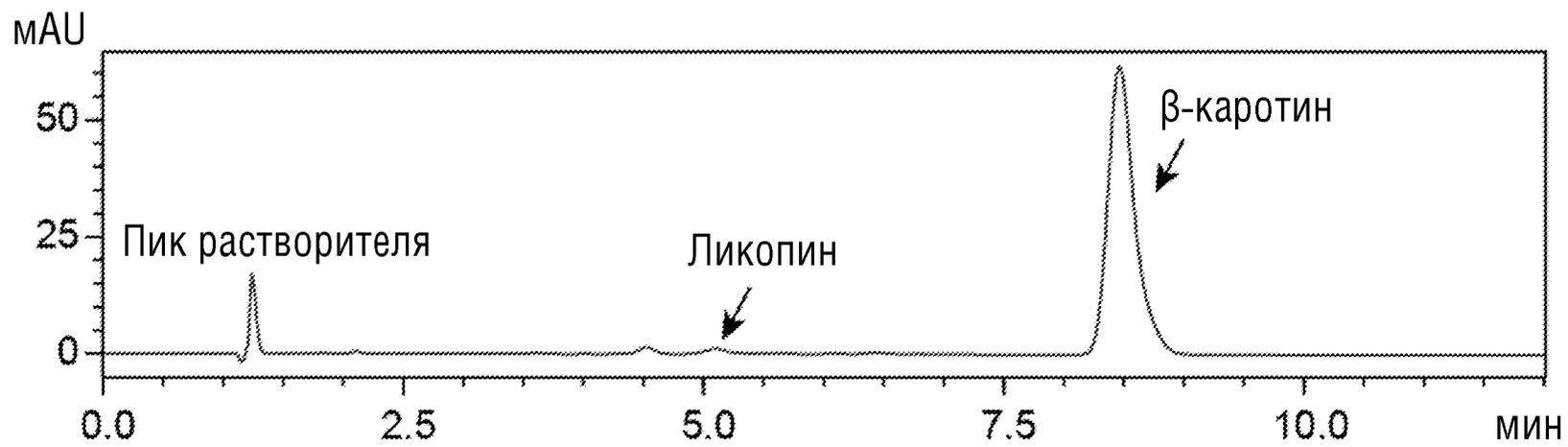
ФИГ.37



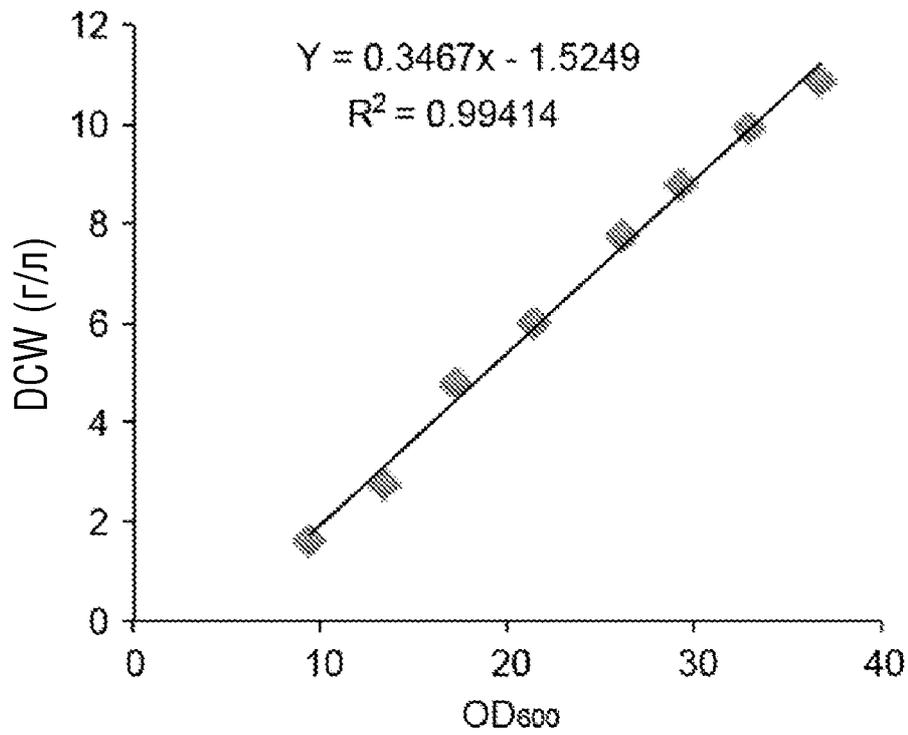
ФИГ.38



ФИГ.39



ФИГ.40А



ФИГ.40В

