

# Разнообразие и распространение метилотрофных дрожжей, используемых в генной инженерии

А.С. Розанов<sup>1</sup>✉, Е.Г. Першина<sup>1</sup>, Н.В. Богачева<sup>1</sup>, В. Шляхтун<sup>1</sup>, А.А. Сычев<sup>2</sup>, С.Е. Пельтек<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ООО «Инновационный центр «Бирюч-НТ», Белгородская область, Россия

✉ e-mail: sibiryak.n@gmail.com

**Аннотация.** Метилотрофные дрожжи используются в качестве платформы для экспрессии гетерологичных белков с 1980-х гг. Они имеют высокий уровень продукции и позволяют получить белки эукариот с приемлемым уровнем гликозилирования. Первая система для экспрессии рекомбинантного белка на основе *Pichia pastoris* была разработана на основе штамма, выделенного из сока дерева на юго-западе США. Система распространялась бесплатно в научных целях и применяется во всем мире. В ходе классификации метилотрофных дрожжей по молекулярно-биологическим маркерам штаммы, используемые для получения рекомбинантного белка, были реклассифицированы как *Komagataella phaffii*. Они находятся в свободном доступе согласно патентному законодательству, однако распространялись на договорной основе. Это делает неопределенным их статус для коммерческого использования и, соответственно, стимулирует поиск альтернативных штаммов для экспрессии рекомбинантного белка. Были адаптированы штаммы других видов метилотрофных дрожжей, среди которых преобладают представители рода *Ogataea*. Несмотря на филогенетическую удаленность представителей рода *Ogataea* и *Komagataella*, во всех случаях оказалось возможным использовать классические векторы и промоторы для экспрессии рекомбинантного белка. Существуют системы экспрессии на основе других штаммов рода *Komagataella*, а также рода *Candida*. Потенциал этих микроорганизмов для генной инженерии далеко не исчерпан. Перспективно как усовершенствование имеющихся систем экспрессии, так и создание новых на основе штаммов, выделенных из природных источников. Исторически до 2009 г. в качестве систем экспрессии использовались штаммы, выделенные на юго-западе США. В настоящее время начали развиваться системы экспрессии на основе штаммов, полученных в Таиланде. Поскольку эта группа микроорганизмов широко представлена по всему миру как в природной, так и в городской среде, можно ожидать появления систем экспрессии рекомбинантных белков, созданных на основе штаммов, выделенных и в других регионах планеты. Ключевые слова: метилотрофные дрожжи; *Pichia pastoris*; *Ogataea*; *Komagataella*; рекомбинантные ферменты.

**Для цитирования:** Розанов А.С., Першина Е.Г., Богачева Н.В., Шляхтун В., Сычев А.А., Пельтек С.Е. Разнообразие и распространение метилотрофных дрожжей, используемых в генной инженерии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):149-157. DOI 10.18699/VJ20.602

## Diversity and occurrence of methylotrophic yeasts used in genetic engineering

A.S. Rozanov<sup>1</sup>✉, E.G. Pershina<sup>1</sup>, N.V. Bogacheva<sup>1</sup>, V. Shlyakhtun<sup>1</sup>, A.A. Sychev<sup>2</sup>, S.E. Peltek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Innovation Centre Biruch-NT, Belgorod region, Russia

✉ e-mail: sibiryak.n@gmail.com

**Abstract.** Methylotrophic yeasts have been used as the platform for expression of heterologous proteins since the 1980's. They are highly productive and allow producing eukaryotic proteins with an acceptable glycosylation level. The first *Pichia pastoris*-based system for expression of recombinant protein was developed on the basis of the tree-juice-derived strain obtained in the US southwest. Being distributed free of charge for scientific purposes, this system has become popular around the world. As methylotrophic yeasts were classified in accordance with biomolecular markers, strains used for production of recombinant protein were reclassified as *Komagataella phaffii*. Although patent legislation suggests free access to these yeasts, they have been distributed on a contract basis. Whereas their status for commercial use is undetermined, the search for alternative strains for expression of recombinant protein continues. Strains of other species of methylotrophic yeasts have been adapted, among which the genus *Ogataea* representatives prevail. Despite the phylogenetic gap between the genus *Ogataea* and the genus *Komagataella* representatives, it turned out possible to use classic vectors and promoters for expression of recombinant protein in all cases. There exist expression systems based on other strains of the genus *Komagataella* as well as the genus *Candida*. The potential of these microorganisms for genetic engineering is far from exhausted. Both improvement of existing expression systems and development of new ones on the basis of strains obtained from nature are advantageous. Historically, strains obtained

on the southwest of the USA were used as expression systems up to 2009. Currently, expression systems based on strains obtained in Thailand are gaining popularity. Since this group of microorganisms is widely represented around the world both in nature and in urban environments, it may reasonably be expected that new expression systems for recombinant proteins based on strains obtained in other regions of the globe will appear.

Key words: methylotrophic yeasts; *Pichia pastoris*; *Ogataea*; *Komagataella*; recombinant enzymes.

**For citation:** Rozanov A.S., Pershina E.G., Bogacheva N.V., Shlyakhtun V., Sychev A.A., Peltek S.E. Diversity and occurrence of methylotrophic yeasts used in genetic engineering. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):149-157. DOI 10.18699/VJ20.602

## Введение

Метилотрофы – группа микроорганизмов, способных использовать одноуглеродные производные метана, такие как метанол, метиламин и др., в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом все связи С–С должны ферментативно формироваться клеточным метаболизмом, что является достаточно трудной для клетки задачей. На это способны некоторые грамотрицательные протеобактерии и грамположительные бактерии (Antony, 1986), а также дрожжи (Wegner, Harder, 1987), имеющие метаболические пути окисления метанола для производства энергии и формирования С–С-связей. Как у дрожжевых, так и у бактериальных микроорганизмов формирование С–С-связей идет через формальдегид (Yurimoto et al., 2005), токсичный промежуточный продукт, который затем либо диссимилирует в CO<sub>2</sub>, либо ассимилируется в биомассу.

Метилотрофные дрожжи были открыты в конце 1960-х гг., когда метилотрофные бактерии уже были хорошо известны. Расхождение во времени открытия связано главным образом со сложностью выделения дрожжей и высоким бактериальным загрязнением образцов (Троценко, Торгонская, 2011). Среды обитания метилотрофных дрожжей – все те, где есть разложение растительного материала с образованием метоксильных групп (почва, поваленные деревья, испорченные фрукты и т. д.). В природе метанол образуется в ходе окисления метана (например, метанооксиляющими бактериями в ризосфере растений), а также при разложении пектина и лигнина (MacDonald, Fall, 1993; Nakagawa et al., 2000). Большинство природных изолятов метилотрофных дрожжей были обнаружены в сокотечении (экссудатах) деревьев или гниющей древесине (Kurtzman, Robnett, 1998; Kurtzman, 2005).

Биотехнологический интерес к метилотрофным организмам возник в начале 1970-х гг., когда метанол был дешевым и считался практически неограниченным сырьем на основе ископаемых ресурсов. Но после нефтяного кризиса 1973 г. цены на углеводороды уже не опускались до прежних значений. Вместо кормового белка из одноклеточных метилотрофов разработчики сосредоточились на получении белка растительного происхождения, в первую очередь сои.

Начиная с 80-х гг. прошлого века метилотрофные дрожжи опять нашли широкое применение, но уже в других областях. Они используются в качестве платформы для генной инженерии и получения рекомбинантных белков в промышленных масштабах и служат удобным объектом для изучения особенностей организации эукариотической клетки. Разрабатываются возможности использования метилотрофных дрожжей в прикладных целях: как мар-

керов загрязнения морского берега, для очистки стоков сульфат-целлюлозного производства и ликеро-водочных заводов, очистки воздуха, загрязненного формальдегидом, и т. д. (Kutty, Philip, 2008; Троценко, Торгонская, 2012; dos Reis et al., 2018).

Наиболее часто в науке и производстве используют метилотрофные дрожжи вида *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*). Они способны усваивать как сахар, так и метанол и дают высокий выход белка. Первоначально в 1970-х гг. компанией Phillips Petroleum было предложено использовать *P. pastoris* в качестве продуцента белка одноклеточных, благодаря их способности расти до высокой плотности как на глюкозе, так и на метаноле (Mishra, Baranwal, 2009). Максимальная плотность клеток, достигаемая в процессе ферментации, превышает 100 г/л сухой массы (Wegner, 1981). В 1980-х на основе *P. pastoris* была разработана система экспрессии гетерологичного белка с использованием сильного и строго регулируемого промотора *AOX1* алкогольоксидазы (Cregg et al., 1985). В сочетании с уже существующими технологиями ферментации для производства кормового белка промотор *AOX1* обеспечивал исключительно высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков. Важная особенность промотора *AOX1* при производстве рекомбинантных белков – высокий уровень его экспрессии в присутствии метанола и надежное ингибирование при его отсутствии, что позволяет регулировать процесс наработки целевых белков, включая аутоксичные варианты (Kurtzman, 2009). Одним из первых крупномасштабных процессов промышленного производства, созданным в 1990-х гг., стало производство растительной ферментной гидроксинитрильной лиазы с выходом более 20 г рекомбинантного белка на литр культуры (Hasslacher et al., 1997).

Другое преимущество *P. pastoris*, помимо промотора *AOX1*, – это низкий уровень гликозилирования. Например, *S. cerevisiae* сейчас вытеснены из производства рекомбинантных белков, так как нередко гипергликозилируют белки, вплоть до их инактивации (Darby et al., 2012).

К настоящему времени системы экспрессии на основе *P. pastoris* широко используются в фундаментальных исследованиях. *P. pastoris* были разработаны первыми среди метилотрофных дрожжей и оказались удобными для биотехнологического получения эукариотических белков, не экспрессирующихся должным образом в бактериях. Активному их распространению в качестве платформы для экспрессии рекомбинантного белка особенно способствовало дальновидное решение компании Phillips Petroleum сделать систему экспрессии доступной для научного сообщества в исследовательских целях. К востребованным коммерчески доступным штаммам

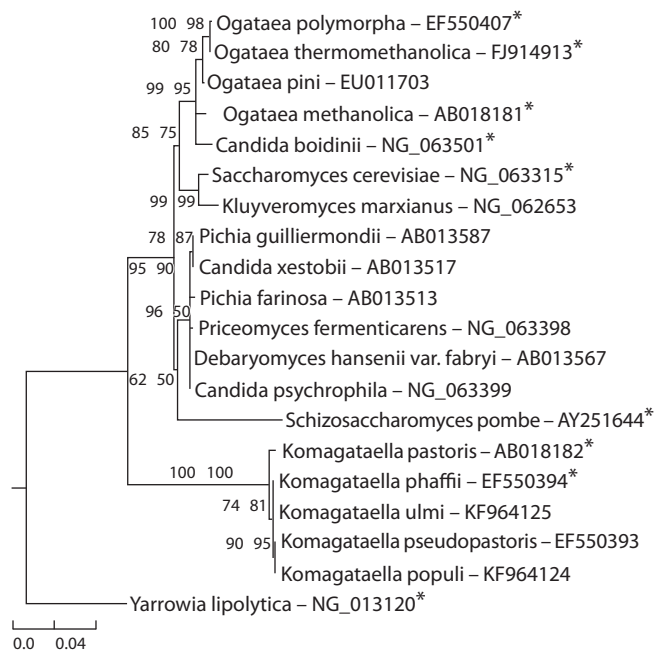
относятся: штамм GS115, ауксотрофный по гистидину; восстановленный прототрофный штамм X-33; нокаутные по *aox1* штаммы KM71 и KM71H, а также дефицитные по протеазам штаммы SMD1168 и SMD1168H и ауксотрофный штамм *ade2* *Pichia*Pink™. Однако применение этих штаммов в коммерческих целях ограничено политикой распространения материала. В связи с этим встал вопрос о поиске альтернативных вариантов, которые могли бы прийти на замену запатентованным штаммам *P. pastoris*.

### Филогенетический анализ

С развитием методов молекулярной биологии и накоплением данных о последовательностях генов для разных видов стало возможным разобраться в филогении метилотрофных дрожжей. И здесь был выявлен ряд неожиданных моментов.

Анализ последовательности генов показал, что дрожжи, известные под общим родовым наименованием *Pichia*, не являются монофилетическими, несмотря на фенотипическое сходство большинства видов. Авторы первых работ установили, что ассимилирующие метанол виды *P. pastoris*, *P. angusta* и *Hansenula polymorpha* отдаленно связаны друг с другом и с *P. membranifaciens*, типовым видом рода *Pichia*. Ямада с коллегами (Yamada et al., 1994, 1995) предложили перенести *P. pastoris* в новый род *Komagataella*, а *P. angusta* классифицировать как *Ogataea polymorpha* во вновь описанный род *Ogataea*. Основанием для выделения новых родов послужил анализ дивергенции в частичных последовательностях рибосомальной РНК (рРНК) большой ядерной субъединицы (LSU) и малой ядерной субъединицы (SSU). Поскольку в каждый анализ было включено относительно немного видов, оставалось неясным, насколько тесно связаны *P. pastoris* и *P. angusta* (*H. polymorpha*) с многочисленными неисследованными видами, и предложение о включении в классификацию новых родов не было принято (Kurtzman, 1998). Однако анализ доменов D1/D2 последовательностей генов рРНК LSU для всех известных в настоящее время аскомицетных дрожжей подтвердил разделение на *Komagataella*, *Ogataea* и *Pichia* (Kurtzman, Robnett, 1998), а филогенетическое разделение, продемонстрированное при изучении последовательности одного гена, было подтверждено в ходе анализа мультигенных последовательностей (Kurtzman et al., 2008). Таким образом, *Komagataella*, *Ogataea* и *Pichia* филогенетически представляют собой отдельные роды. С точки зрения таксономии более правильным названием является *Komagataella pastoris*, но исторически и по сей день наиболее распространенным остается название *P. pastoris*.

Позднее было установлено, что под видовым названием *P. pastoris* объединено по меньшей мере два вида дрожжей – *Komagataella phaffii* и *K. pastoris* (Cregg et al., 1993; Kurtzman, 2009). Анализ последовательности генов показал, что это не единственные представители рода *Komagataella*. К роду *Komagataella* были отнесены *P. pseudopastoris* на основе анализа рРНК LSU и SSU (Dlauchy et al., 2003), а также вид *K. phaffii* на основании анализа фрагмента D1/D2 гена рРНК LSU (Kurtzman et al., 2008).



Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей гена 18S рРНК видов семейства Saccharomycetaceae с помощью метода максимального правдоподобия.

Коэффициенты поддержки SH-Like aLRT и UfBoot (%) обозначены в узлах ветвей дерева. Справа от видовых названий приведены идентификационные номера соответствующих последовательностей в базе данных NCBI. Звездочкой помечены виды, на которых созданы системы экспрессии гетерологического белка.

Развитие методов массового параллельного секвенирования привело к накоплению информации о геномных последовательностях большого числа микроорганизмов, в том числе и метилотрофных дрожжей, что позволяет проводить более подробный филогенетический анализ. Наиболее распространенным и консервативным маркером для анализа филогенетических отношений между различными представителями грибов является последовательность гена 18S rRNA. Соответствующие гены были экстрагированы из геномов метилотрофных дрожжей, представленных в базе данных NCBI, и использованы для построения филогенетического дерева (см. рисунок).

Нуклеотидные последовательности были выровнены с помощью алгоритма MAFFT в программе MAFFT v7.312 (Katoh, Standley, 2013). Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия в программе IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). Для определения лучшей схемы моделей нуклеотидных замен использовались параметры –auto и +R (FreeRate heterogeneity), основным параметром служило наименьшее значение критерия Акаике (AICc). Для статистической поддержки максимального правдоподобия в программе IQ-TREE применялись два коэффициента: SH-like aLRT (1000 репликаций) и сверхбыстрый бутстреп (UfBoot, 1000 репликаций).

Метилотрофные дрожжи, используемые для производства рекомбинантного белка, разделились на три клады: *Pichia*, *Ogataea* и *Komagataella* (см. рисунок). Можно сделать вывод о том, что род *Ogataea* филогенетически более гетерогенный в сравнении с *Pichia* и *Komagataella*.

## Метилотрофные дрожжи, используемые для производства рекомбинантного белка в качестве альтернативных штаммов, и их распространение в природе

*P. pastoris* (*K. phaffii* и *K. kurtzmanii*). Группа дрожжей *P. pastoris*, большинство представителей которой после ревизии классификации было отнесено к роду *Komagataella*, наиболее изучена среди метилотрофных дрожжей. Типичная среда обитания – сокоотечение деревьев от умеренного до тропического регионов. Впервые *P. pastoris* были выделены из сокоотечения каштана во Франции, в дальнейшем обнаружено их широкое распространение в Венгрии и США (Spencer et al., 1996; Negruta et al., 2010; Kurtzman, 2011a). Кроме того, дрожжи *P. pastoris* найдены в сокоотечении масличной пальмы в Нигерии (Faparusi, 1974), соке белого альгарробо в Аргентине (Spencer et al., 1995) и красного дуба в Канаде (Bowles, Lachance, 2007). Интересно отметить зональность их распространения: в лесах тихоокеанского побережья северо-западной части США это доминирующий вид метилотрофных дрожжей, в Европе, Африке и Южной Америке они встречаются, но не преобладают, а в Японии их вообще не обнаружено (Lachance et al., 1982).

Несмотря на распространенность системы экспрессии, запатентованной Philips Petroleum на основе *P. pastoris*, идет поиск альтернативных штаммов метилотрофных дрожжей с целью разработки платформ для производства рекомбинантного белка, не защищенных патентами от коммерческого использования.

Штамм *P. pastoris* (*K. phaffii*) CBS7435 наиболее близок к предложенным в свое время компанией Philips Petroleum. Полученные на его основе штаммы патентно не защищены (Ahmad et al., 2014). При этом он является предшественником запатентованных штаммов, наиболее используемых в настоящее время в производстве рекомбинантного белка. С одной стороны, это облегчает применение производных штамма CBS7435 ввиду широкой базы знаний, полученных с их помощью, с другой стороны, не все модификации генома для данного штамма можно патентовать из-за их описания в академической литературе и патентах.

Использование штамма *K. kurtzmanii* Y-727/КБП 2878/Starmer 75-208.2/CBS 12817/RRRL Y-63667 в качестве реципиента для конструирования продуцентов целевого белка было запатентовано в Российской Федерации. Этот штамм выделен проф. Стармером из сокоотечения пихты, растущей в горах Аризоны, США (Naumov et al., 2013), и является одним из наиболее близких родственников штамма *P. pastoris* (*K. phaffii*) CBS7435.

*P. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*). Источники выделения представителей спорообразующего вида *P. guilliermondii* разнообразны: растения, озерная вода, коровий рубец, загрязненные нефтью почвы. Кроме того, дрожжи были обнаружены в насекомых, живущих на вязах; в незагрязненной почве и воде (Negruta et al., 2010a); в креветках и других беспозвоночных; в морской воде со сниженной концентрацией соли (Kutty, Philip, 2008). Ранее дрожжи этого вида использовались в генной инженерии, но как источник генов, которые в том числе были экспрессированы в *P. pastoris* (Handumrongkul

et al., 1998; Zhang et al., 2009), а не в качестве системы экспрессии.

Поскольку большинство метилотрофных дрожжей имеют сходный метанол-индуцируемый промотор в путях утилизации метанола (Hartner, Glieder, 2006), группа исследователей из Малайзии проверила предположение о возможности использования экспрессирующих конструкций, разработанных на *K. phaffii*, для экспрессии рекомбинантного белка в других метилотрофных дрожжах (Oslan et al., 2015). Они выделили штамм, названный *Pichia sp. strain SO*, из испорченного апельсина; последовательность SSU показала его 100 % сходство с *P. guilliermondii*. Далее авторы установили, что зеоцин может быть использован в качестве селекционного маркера для штамма SO (Oslan et al., 2012), и провели работы по клонированию конструкции, экспрессирующей рекомбинантную липазу. Исследование получило дальнейшее развитие, и в 2017 г. была опубликована статья с описанием оптимизации экспрессии ранее полученного на основе *P. guilliermondii* продуцента липазы T1 из *Geobacillus zalihae*. В работе продемонстрировано трехкратное увеличение продукции липазы (Abu et al., 2017).

*P. (Ogataea) methanolica* была предложена компанией Invitrogen (США) в качестве платформы для продукции рекомбинантных белков несколько позже, чем *P. pastoris*. Впервые ее выделили из пробы почвы в Японии в 1974 г., штаммы этого вида также были выделены в США (Sibirny, 1996; Kurtzman, 2011b). В 2008 г. дрожжи этой группы (гетерогенной, как и *P. pastoris*) были выделены на территории России из галлов ивы (Glushakova et al., 2010). *P. (O.) methanolica* не нашла широкого применения как платформа для получения рекомбинантного белка, хотя есть отдельные сообщения о ее использовании, например, для экспрессии глутаматдекарбоксилазы человека (Raymond et al., 1998). Возможно, низкое распространение *P. (O.) methanolica* с целью получения рекомбинантного белка обусловлено наличием у Invitrogen другой платформы – на основе *P. pastoris* (*K. phaffii*).

*Hansenula (O.) polymorpha* – это широко распространенные в природе термотолерантные метилотрофные дрожжи, способные расти при температуре до 50 °С. Одной из характерных сред обитания *H. polymorpha*, помимо обычных для метилотрофных дрожжей гниющих фруктов и других растений, является организм насекомых, в том числе лабораторных линий *Drosophila melanogaster* (Spencer J., Spencer D., 1997).

В науке *H. polymorpha* использовали как модельный организм для изучения механизмов пероксисомального биогенеза и деградации, регуляции метаболизма метанола, ассимиляции нитратов и реакции на стресс (van der Klei et al., 2006). Дрожжи оказались достаточно эффективны и для продукции рекомбинантных белков (Gellissen, 2005). Наиболее значимым терапевтическим белком, полученным с использованием *H. polymorpha*, является рекомбинантный антиген вируса гепатита В (HBsAg), который был успешно коммерциализирован под торговыми марками НераVax-Gene и AgB (Seo et al., 2008). На основе *H. polymorpha* разработаны продуценты рекомбинантных белков с высоким потенциалом для фармацевтических целей: гирудин из пиявки *Hirudinaria manillensis*

(Weydemann et al., 1995) и некоторые человеческие белки, включая  $\alpha$ 1-антитрипсин (Kang et al., 1998), IFN $\alpha$ -2a (Degelmann et al., 2002), сывороточный альбумин (Kang et al., 2001), эпидермальный фактор роста (Heo et al., 2002) и паратиреоидный гормон (Sohn et al., 2012). Помимо белков медицинского назначения, были разработаны продуценты пищевых и промышленных ферментов: гекозооксидазы (Cook, Thygesen, 2003), фитазы (Mayer et al., 1999), левансуказы из *Zymomonas mobilis* (Park et al., 2004) и глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* (Kim et al., 2004).

***P. (O.) thermomethanolic***. Одним из наиболее проработанных вариантов метилотрофных дрожжей для продукции рекомбинантного белка, кроме представленных в Invitrogen, в настоящее время можно считать штамм *O. thermomethanolic* BCC16875. Распространение *O. thermomethanolic* практически не изучено, поскольку этот вид дрожжей открыт совсем недавно – в 2005 г. в образцах почвы в Таиланде (Limtong et al., 2005).

Информация о штамме BCC16875 впервые была опубликована группой исследователей из Таиланда в 2012 г. Они описали проверку возможности использования молекулярно-биологических инструментов для наработки рекомбинантного белка в выбранном штамме. Классические промоторы гена метанол-индуцируемой алкогольоксидазы (*AOX1*) и конститутивные гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAP*), используемые для работы с *P. pastoris*, проявили свою активность в новом штамме. Рекомбинантная фитаза и ксиланаза экспрессировались с обоих промоторов в виде секретируемых белков, причем первый демонстрировал различные паттерны N-гликозилирования в зависимости от промотора и культуральной среды. Основным видом олигосахаридов гликопротеинов, продуцируемым *O. thermomethanolic* BCC16875, является Man8-12GlcNAc2, который аналогичен таковому у других метилотрофов. Кроме того, обнаружены также модификации маннозил фосфата и  $\alpha$ -1,6- и  $\alpha$ -1,2-маннозы гетерологичного секретируемого белка. Уровень экспрессии рекомбинантного белка оказался на уровне промышленных штаммов, что делает предложенную платформу хорошей альтернативой штаммам от Invitrogen (Tanapongpipat et al., 2012).

В последние годы были изучены промоторы, характерные для штамма *O. thermomethanolic* BCC16875 (Harnpicharnchai et al., 2014; Promdonkoy et al., 2014), исследовались методы культивирования высокой плотности для экспрессии рекомбинантных белков (Charoenrat et al., 2016). Кроме того, начаты работы по оптимизации метаболизма штамма для увеличения выхода целевых продуктов. Так, с этой целью был увеличен уровень экспрессии вспомогательных белков эндоплазматического ретикула (Roongsawang et al., 2016). Особенно активно штамм стал изучаться после 2016 г.; появилось значительное число работ по доведению его до современного уровня в качестве экспрессирующей системы. В 2018 г. для работы со штаммом была адаптирована система CRISPR-Cas9 (Phithakrotchanakoon et al., 2018b), сконструирована новая система экспрессии, основанная на индукции сахарозой (Puseenam et al., 2018; Woonchoo et al., 2019), были продолжены исследования метаболизма на протеомном и транскриптомном уровне (Phithakrotchanakoon et al., 2018a).

***Candida boidinii*** – первый описанный вид метилотрофных дрожжей и, по-видимому, наиболее распространенный в естественной среде (Ogata et al., 1969). В основном это различные растительные субстраты (сок деревьев, испорченные фрукты, некоторые цветы). Дрожжи обильно представлены также в оливках натуральной ферментации (Coton et al., 2006), обнаружены в кактусах – в их гнилых частях встречается как *C. boidinii*, так и *O. polymorpha*, хотя и не преобладают среди выделенных в этих пробах дрожжей. *C. boidinii* являются важным маркером загрязнения морского берега. Их линии доминируют во многих пробах воды и песка в Бразилии (Kutty, Philip, 2008).

Согласно филогенетическому дереву, построенному по гену 18S rRNA (см. рисунок), *C. boidinii* скорее можно отнести к роду *Ogataea*. Группа исследователей из Японии до 2009 г. разрабатывала *C. boidinii* как платформу для продукции рекомбинантных белков, альтернативную *P. pastoris* (Yurimoto, Sakai, 2009). Система экспрессии рекомбинантного белка на основе *C. boidinii* имеет некоторые характеристики, которые могут быть полезными по сравнению с другими метилотрофными дрожжами. Выбор различных источников углерода приводит к трем различным уровням экспрессии в *C. boidinii*: промотор *AOD1* показывает высокий уровень экспрессии в клетках, выращенных на метаноле или метаноле с глицерином в качестве источника углерода, средний уровень экспрессии в клетках, выращенных на глицерине, и блокирование экспрессии при культивировании на глюкозе или этаноле (Sakai et al., 1995; Yurimoto et al., 2000). Уровень экспрессии у *C. boidinii* значительно выше, чем у *O. polymorpha*. Кроме того, высокий уровень экспрессии у *C. boidinii* может быть получен с использованием среды метанол + глицерин, что позволяет сократить время культивирования для достижения высокой плотности клеток. У *P. pastoris* глицерин подавляет экспрессию генов, индуцируемых метанолом, поэтому требуется контроль полного выедания глицерина в среде до индукции метанолом. Как и для *P. pastoris*, для *C. boidinii* доступен штамм с нокаутированной вакуолярной протеиназой А (PEP4) и протеиназой В (PRB1) (Komeda et al., 2002). В ходе исследований с использованием системы экспрессии генов у *C. boidinii* были разработаны штаммы для производства токсичных белков – мембраносвязанная пероксисома, позволяющая накапливать токсичные белки (Nishikawa et al., 2000; Yurimoto et al., 2001), и эффективная система секреции для продукция активной транскламиназы (Yurimoto et al., 2004).

### Выделение метилотрофных дрожжей из природных источников

Дрожжи выделяют из водных, морских, атмосферных и наземных мест обитания. Они обитают в гниющих овощах и фруктах, плесени, соке и коре деревьев, в насекомых-ксилофагах, пищеварительном тракте свиней, молоке больных маститом коров, в лесных, садовых и заброшенных почвах, особенно орошаемых сточными водами, в водорослях и т. д. (Negruta et al., 2010; Троценко, Торгонская, 2011). Эти экологические предпочтения связаны, по всей видимости, с образованием метоксильных групп при разложении лигнина и пектина (Nakagawa et al.,

2005). Помимо соков фруктов и почвенных образцов, метилотрофные дрожжи обнаруживают в продуктах питания (Mu et al., 2012; Kozhakhmetov et al., 2016; Syromyatnikov et al., 2018).

Многие дрожжи распространены широко, тогда как некоторые имеют ограниченный ареал обитания. Они редко встречаются в природе в отсутствие мицелийных грибов и бактерий. Следовательно, для их выделения необходимы селективные методы, которые позволяют дрожжам иметь преимущество в скорости роста. При разработке сред для селективного выделения дрожжей обычно используют низкий pH, поскольку в таких условиях дрожжи имеют преимущество перед бактериями. Среда может также содержать антибиотики для подавления бактерий и фунгистатические агенты для подавления плесени (Kurtzman et al., 2011).

Когда дрожжи присутствуют в большом количестве, они могут быть выделены путем непосредственного нанесения материала или суспензий материала на подкисленную агаризованную среду, которая тоже может содержать антибиотики или иметь другие селективные свойства. Агар в среде с низким pH гидролизует при автоклавировании. Поэтому агар и среду стерилизуют отдельно, охлаждают до температуры ~45 °C, смешивают и разливают в чашки Петри. Большинство видов дрожжей можно культивировать при pH 3.7, но некоторые виды, такие как представители рода *Schizosaccharomyces*, требуют более высокого pH, в диапазоне от 4.5 до 5.0. Если в образце присутствует небольшое количество дрожжей, размер популяции можно увеличить, предварительно инкубируя образец в жидкой среде при pH до 3.8 (Kurtzman et al., 2011).

Для выделения конкретных физиологических групп дрожжей необходимо подбирать дополнительные селективные параметры. Метилотрофные дрожжи могут быть отобраны путем применения метанола в качестве единственного источника углерода и энергии в среде. Так, при выделении метилотрофных дрожжей с листьев винограда в Таиланде для получения накопительной культуры была использована среда YNB с добавлением 0.5 % метанола. Культивирование проводилось при 27 °C в течение четырех-пяти дней, после чего производился рассев накопительных культур на агаризованную среду YNB + 0.5 % метанола. В результате выделено два новых вида, отнесенных к роду *Ogataea* (Limtong et al., 2013).

## Заключение

Метилотрофные дрожжи применяются в качестве платформы для производства рекомбинантного белка. Первоначально они были вовлечены в сферу интересов биотехнологических компаний в качестве продуцентов белка одноклеточных, но в связи с нефтяным кризисом 1973 г. стоимость метанола повысилась и получение кормового белка из него стало неактуальным. В то же время, по мере открытия ключевых для молекулярной биологии белков, таких как термостабильные полимераза, лигазы и рестриктазы, стали развиваться методы модификации микроорганизмов, в том числе для продукции рекомбинантных белков.

Производство белков с использованием микроорганизмов активно развивалось с 1940-х гг. для различных целей, прежде всего для пищевой, кормовой и технологической отраслей. В первую очередь это было связано с использованием природных продуцентов, во многих случаях улучшенных с помощью ненаправленного мутагенеза. С появлением методов молекулярной биологии стало возможным разрабатывать продуценты белков, нетипичных для конкретного организма (гетерологичных или рекомбинантных белков), в том числе с использованием дрожжей.

На этой волне компания Phillips Petroleum разработала свою систему экспрессии рекомбинантных белков на основе *P. pastoris* (позднее переименована в *Komagataella phaffii*). Благодаря своим высоким технологическим качествам, а также принятому в Phillips Petroleum решению о ее свободном распространении для научных исследований, эта система широко применяется в качестве платформы для продукции рекомбинантного белка.

Важным для дальнейшего развития белок-экспрессирующих платформ является понимание ключевых свойств, способствовавших распространению экспрессирующих систем на основе *P. pastoris*. Первое свойство – высокий уровень продукции белка. Он ниже, чем у бактерий и мицелийных грибов, но выше, чем у других систем – клеток млекопитающих, растений и насекомых. Второе: дрожжи – это эукариоты. Они имеют все клеточные компартменты, необходимые для синтеза и сборки эукариотических белков, что позволяет им синтезировать белки, которые нельзя получить, используя бактериальные экспрессирующие системы. Третье – способность к синтезу внеклеточного белка, что удешевляет процесс производства. Четвертое – низкий уровень гликозилирования белков в сравнении со многими другими дрожжами.

Помимо *K. phaffii*, в качестве платформы для экспрессии рекомбинантного белка разрабатывались и другие метилотрофные дрожжи. Прежде всего отметим, что как патентно-независимую платформу было предложено использовать исходный для системы Invitrogen штамм *P. pastoris* CBS7435. В России запатентован штамм *Komagataella kurtzmanii* американского происхождения. В США в качестве альтернативных были созданы экспрессирующие платформы на основе рода *Ogataea*: *Hansenula (Ogataea) polymorpha* и *Pichia (Ogataea) methanolica*, последняя принадлежит Invitrogen. В Японии разработана альтернативная платформа на основе *Candida boidinii*; система развивалась до 2009 г., но позже этот организм не упоминался в качестве платформы для производства рекомбинантного белка. Исследователи Малайзии для продукции белка предложили штамм *P. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), а Таиланда – *P. thermomethanolica*.

Интересно отметить, что все штаммы дрожжей, с помощью которых создавали гетерологичные белки до 2009 г., имеют американское происхождение. В связи с этим возникает вопрос, не являются ли свойства, способствующие продукции белка в дрожжах, уникальными для американских изолятов. Более поздние исследования свидетельствуют о том, что это не совсем так. В те годы бурное развитие биологической науки, в том числе открытие новых базовых методов молекулярной биологии, происходило на юго-западе США, а разработка амери-

канскими исследователями первых штаммов велась в одном штате. По-видимому, этот факт стал основной причиной использования штаммов именно этого региона. Российский же патент копирует известные системы, что требует использования наиболее близких видов, которые в большинстве случаев имеют близкие географические ареалы обитания.

В целом альтернативные системы на основе метилотрофных дрожжей пока не получили значительного распространения. Причин для этого может быть множество. Наиболее вероятными представляются отсутствие заинтересованности у основных игроков рынка рекомбинантных белков и неспособность новых участников этого рынка вклиниться в процесс с новой системой. Например, китайские производители активно используют штаммы, полученные на основе штаммов Invitrogen. Тем не менее исследования новых систем экспрессии на основе метилотрофных дрожжей ведутся, возможны также доработки путем геномного редактирования уже имеющихся систем с целью повышения продукции белка и оптимизации его гликозилирования.

## Список литературы / References

- Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Метилотрофные дрожжи. М.: ТР-Принт, 2011.  
[Trotsenko Yu.A., Torgonskaya M.L. Methylotrophic Yeasts. Moscow: TR-Print Publ., 2011. (in Russian)]
- Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Аэробные метилотрофы – перспективные объекты современной биотехнологии. Журн. СФУ. Биология. 2012;5(3):243-279.  
[Trotsenko Yu.A., Torgonskaya M.L. Aerobic methylotrophs – promising objects of modern biotechnology. J. Siberian Federal University. Biology. 2012;5(3):243-279. (in Russian)]
- Abu M.L., Nooh H.M., Oslan S.N., Salleh A.B. Optimization of physical conditions for the production of thermostable T1 lipase in *Pichia guilliermondii* strain SO using response surface methodology. BMC Biotechnol. 2017;17:78. DOI 10.1186/s12896-017-0397-7.
- Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014;98:5301-5317. DOI 10.1007/s00253-014-5732-5.
- Anthony C. Bacterial oxidation of methane and methanol. Adv. Microbial Physiol. 1986;27:113-210. DOI 10.1016/S0065-2911(08)60305-7.
- Boonchoo K., Puseenam A., Kocharin K., Tanapongpipat S., Roongsawang N. Sucrose-inducible heterologous expression of phytase in high cell density cultivation of the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. FEMS Microbiol. Lett. 2019;366(5). DOI 10.1093/femsle/fnz052.
- Bowles J.M., Lachance M.-A. Patterns of variation in the yeast flora of exudates in an oak community. Can. J. Bot. 2007;61(12):2984-2995. DOI 10.1139/b83-335.
- Charoenrat T., Antimanon S., Kocharin K., Tanapongpipat S., Roongsawang N. High cell density process for constitutive production of a recombinant phytase in thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* using table sugar as carbon source. Appl. Biochem. Biotechnol. 2016;180:1618-1634. DOI 10.1007/s12010-016-2191-8.
- Cook M.W., Thygesen H.V. Safety evaluation of a hexose oxidase expressed in *Hansenula polymorpha*. Food Chem. Toxicol. 2003;41:523-529. DOI 10.1016/S0278-6915(02)00280-6.
- Coton E., Coton M., Levert D., Casaregola S., Sohler D. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. Int. J. Food Microbiol. 2006;108:130-135. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016.
- Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y., Madden K.R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. Mol. Cell. Biol. 1985;12(12):3376-3385. DOI 10.1128/mcb.5.12.3376.
- Cregg J.M., Vedvick T.S., Raschke W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology (NY). 1993;11:905-910. DOI 10.1038/nbt0893-905.
- Darby R.A.J., Cartwright S.P., Dilworth M.V., Bill R.M. Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (Review). In: Bill R.M. (Ed.). Recombinant Protein Production in Yeast: Methods and Protocols. Humana Press, 2012;11-23. DOI 10.1007/978-1-61779-770-5\_2.
- Degelema A., Müller F., Sieber H., Jenzelewski V., Suckow M., Strasser A.W.M., Gellissen G. Strain and process development for the production of human cytokines in *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res. 2002;2:349-361. DOI 10.1016/S1567-1356(02)00096-X.
- Dlauchy D., Tornai-Lehoczki J., Fülöp L., Péter G. *Pichia (Komagataella) pseudopastoris* sp. nov., a new yeast species from Hungary. Antonie van Leeuwenhoek. 2003;83:327-332. DOI 10.1023/A:1023318829389.
- dos Reis K.C., Arrizon J., Amaya-Delgado L., Gschaedler A., Schwan R.F., Silva C.F. Volatile compounds flavoring obtained from Brazilian and Mexican spirit wastes by yeasts. World J. Microbiol. Biotechnol. 2018;34(152). DOI 10.1007/s11274-018-2535-3.
- Faparusi S.I. Microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) tap holes. J. Food Sci. 1974;39(4):755-757. DOI 10.1111/j.1365-2621.1974.tb17972.x.
- Gellissen G. (Ed.). Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. John Wiley & Sons, 2005.
- Glushakova A.M., Maximova I.A., Kachalkin A.V., Yurkov A.M. *Ogataea cecidiorum* sp. nov., a methanol-assimilating yeast isolated from galls on willow leaves. Antonie van Leeuwenhoek. 2010;98(1):93-101. DOI 10.1007/s10482-010-9433-5.
- Handumrongkul C., Ma D.P., Silva J.L. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (*xy11*) in *Pichia pastoris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998;49:399-404. DOI 10.1007/s002530051189.
- Hampichamchai P., Promdonkoy P., Sae-Tang K., Roongsawang N., Tanapongpipat S. Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter from a thermotolerant yeast, *Pichia thermomethanolica*, for heterologous gene expression, especially at elevated temperature. Ann. Microbiol. 2014;64:1457-1462. DOI 10.1007/s13213-013-0765-z.
- Hartner F.S., Glieder A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. Microb. Cell Fact. 2006;5(39). DOI 10.1186/1475-2859-5-39.
- Hasslacher M., Schall M., Hayn M., Bona R., Rumbold K., Lückl J., Griengl H., Kohlwein S.D., Schwab H. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. Protein Expr. Purif. 1997;11:61-71. DOI 10.1006/prep.1997.0765.
- Heo J.H., Won H.S., Kang H.A., Rhee S.K., Chung B.H. Purification of recombinant human epidermal growth factor secreted from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Protein Expr. Purif. 2002;24(1):117-122. DOI 10.1006/prep.2001.1527.
- Kang H.A., Kang W., Hong W.K., Kim M.W., Kim J.Y., Sohn J.-H., Choi E.S., Choe K.B., Rhee S.K. Development of expression systems for the production of recombinant human serum albumin using the MOX promoter in *Hansenula polymorpha* DL-1. Biotechnol. Bioeng. 2001;76(2):175-185. DOI 10.1002/bit.1157.
- Kang H.A., Sohn J.-H., Choi E.-S., Chung B.H., Yu M.-H., Rhee S.-K. Glycosylation of human  $\alpha$ 1-antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts. Yeast. 1998;14(4):371-381. DOI 10.1002/(SICI)1097-0061(19980315)14:4<371::AID-YEA231>3.0.CO;2-1.
- Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 2013;30(4):772-780. DOI 10.1093/molbev/mst010.
- Kim M.W., Rhee S.K., Kim J.Y., Shimma Y.I., Chiba Y., Jigami Y., Kang H.A. Characterization of N-linked oligosaccharides assembled

- on secretory recombinant glucose oxidase and cell wall mannoproteins from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Glycobiology*. 2004;14(3):243-251. DOI 10.1093/glycob/cwh030.
- Komeda T., Sakai Y., Kato N., Kondo K. Construction of protease-deficient *Candida boidinii* strains useful for recombinant protein production: cloning and disruption of proteinase A gene (*PEP4*) and proteinase B gene... *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002;66(3):628-631. DOI 10.1271/bbb.66.628.
- Kozhakhmetov S., Tynybayeva I., Baikhanova D., Saduakhasova S., Saduakhasova G., Saduakhasova A., Nurgozhin T., Zhumadilov Z. Metagenomic analysis of koumiss in Kazakhstan. *Cent. Asian J. Glob. Health*. 2016;3(Suppl.). DOI 10.5195/cajgh.2014.163.
- Kurtzman C.P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55:973-976. DOI 10.1099/ijs.0.63491-0.
- Kurtzman C.P. *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. In: Kurtzman C.P., Fell J.W. (Eds.). *The Yeasts: A Taxonomical Study*. Elsevier, Bv, 1998; 273-352. DOI 10.1016/b978-044481312-1/50046-0.
- Kurtzman C.P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009;36:1435-1438. DOI 10.1007/s10295-009-0638-4.
- Kurtzman C.P. *Komagataella* Y. Yamada, Matsuda, Maeda & Mikata (1995). In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.). *The Yeasts: A Taxonomical Study*. 5th edn. 2011a;491-495. DOI 10.1016/B978-0-444-52149-1.00037-9.
- Kurtzman C.P. *Ogataea* Y. Yamada, K. Maeda & Mikata (1994). In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.). *The Yeasts: A Taxonomical Study*. 5th edn. 2011b;645-671. DOI 10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.). *The Yeasts: A Taxonomical Study*. 5th edn. 2011;87-110. DOI 10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998;73:331-371. DOI 10.1023/A:1001761008817.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J., Basehoar-Powers E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene phylogenetic analysis and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res.* 2008;8(6):939-954. DOI 10.1111/j.1567-1364.2008.00419.x.
- Kutty S.N., Philip R. Marine yeasts – a review. *Yeast*. 2008;25:465-483. DOI 10.1002/yea.1599.
- Lachance M.A., Metcalf B.J., Starmer W.T. Yeasts from exudates of *Quercus*, *Ulmus*, *Populus*, and *Pseudotsuga*: new isolations and elucidation of some factors affecting ecological specificity. *Microb. Ecol.* 1982;8:191-198. DOI 10.1007/BF02010452.
- Limtong S., Kaewwichian R., Groenewald M. *Ogataea kanchanaburiensis* sp. nov. and *Ogataea wangdongensis* sp. nov., two novel methylotrophic yeast species from phylloplane in Thailand. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013;103:551-558. DOI 10.1007/s10482-012-9837-5.
- Limtong S., Srisuk N., Yongmanitchai W., Yurimoto H., Nakase T., Kato N. *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55:2225-2229. DOI 10.1099/ijs.0.63712-0.
- MacDonald R.C., Fall R. Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere. *Atmos. Environ.* 1993;27(11):1709-1713. DOI 10.1016/0960-1686(93)90233-0.
- Mayer A.F., Hellmuth K., Schlieker H., Lopez-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U., Strasser A.W.M., Van Loon A.P.G.M. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for yeast production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* 1999;63(3):373-381. DOI 10.1002/(SICI)1097-0290(19990505)63:3<373::AID-BIT14>3.0.CO;2-T.
- Mishra S., Baranwal R. Yeast genetics and biotechnological applications. In: Satyanarayana T., Kunze G. (Eds). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, 2009;323-355. DOI 10.1007/978-1-4020-8292-4\_16.
- Mu Z., Yang X., Yuan H. Detection and identification of wild yeast in koumiss. *Food Microbiol.* 2012;31:301-308. DOI 10.1016/j.fm.2012.04.004.
- Nakagawa T., Miyaji T., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N., Tomizuka N. A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;66(10):4253-4257. DOI 10.1128/AEM.66.10.4253-4257.2000.
- Nakagawa T., Yamada K., Fujimura S., Ito T., Miyaji T., Tomizuka N. Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Microbiology*. 2005;151(6):2047-2052. DOI 10.1099/mic.0.27895-0.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013;104:339-347. DOI 10.1007/s10482-013-9956-7.
- Negruta O., Csutak O., Stoica I., Rusu E., Vassu T. Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism. *Rom. Biotechnol. Lett.* 2010;15(4):5369-5375.
- Nishikawa M., Hagishita T., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y., Hatanaoka T. Primary structure and expression of peroxisomal acetylsermidine oxidase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *FEBS Lett.* 2000;476:150-154. DOI 10.1016/S0014-5793(00)01708-7.
- Ogata K., Nishikawa H., Ohsugi M. A yeast capable of utilizing methanol. *Agr. Biol. Chem.* 1969;33(10):1519-1520. DOI 10.1080/00021369.1969.10859497.
- Oslan S.N., Salleh A.B., Rahman R.N.Z.R.A., Basri M., Chor A.L.T. Locally isolated yeasts from Malaysia: identification, phylogenetic study and characterization. *Acta Biochim. Pol.* 2012;59(2):225-229. DOI 10.18388/abp.2012\_2142.
- Oslan S.N., Salleh A.B., Rahman R.N.Z.R.A., Leow T.C., Sukamat H., Basri M. A newly isolated yeast as an expression host for recombinant lipase. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2015;20(2):279-293. DOI 10.1515/cmb-2015-0015.
- Park B.S., Vladimir A., Kim C.H., Rhee S.K., Kang H.A. Secretory production of *Zymomonas mobilis* levansucrase by the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Enzyme Microb. Technol.* 2004;34:132-138. DOI 10.1016/j.enzmictec.2003.09.005.
- Phithakrotchanakoon C., Puseenam A., Phaonakrop N., Roytrakul S., Tanapongpipat S., Roongsawang N. *Hac1* function revealed by the protein expression profile of a *OthAc1* mutant of thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *Mol. Biol. Rep.* 2018a;45:1311-1319. DOI 10.1007/s11033-018-4287-4.
- Phithakrotchanakoon C., Puseenam A., Wongwisansri S., Eurwilai-chitr L., Ingsriswang S., Tanapongpipat S., Roongsawang N. CRISPR-Cas9 enabled targeted mutagenesis in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018b;365(11). DOI 10.1093/femsle/fny105.
- Promdonkoy P., Tirasophon W., Roongsawang N., Eurwilai-chitr L., Tanapongpipat S. Methanol-inducible promoter of thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* BCC16875 potential for production of heterologous protein at high temperatures. *Curr. Microbiol.* 2014;69:143-148. DOI 10.1007/s00284-014-0568-x.
- Puseenam A., Kocharin K., Tanapongpipat S., Eurwilai-chitr L., Ingsriswang S., Roongsawang N. A novel sucrose-based expression system for heterologous proteins expression in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018;365(20). DOI 10.1093/femsle/fny238.
- Raymond C.K., Bukowski T., Holderman S.D., Ching A.F.T., Vanaaja E., Stamm M.R. Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase. *Yeast*. 1998;14:11-23. DOI 10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1<11::AID-YEA196>3.0.CO;2-S.



- Roongsawang N., Pusencam A., Kitikhun S., Sae-Tang K., Hampicharnchai P., Ohashi T., Fujiyama K., Tirasophon W., Tanapongpipat S. A novel potential signal peptide sequence and overexpression of ER-resident chaperones enhance heterologous protein secretion in thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016;178:710-724. DOI 10.1007/s12010-015-1904-8.
- Sakai Y., Rogi T., Takeuchi R., Kato N., Tani Y. Expression of *Saccharomyces* adenylate kinase gene in *Candida boidinii* under the regulation of its alcohol oxidase promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995;42:860-864. DOI 10.1007/BF00191182.
- Seo H.S., Park J.S., Han K.Y., Bae K.D., Ahn S.J., Kang H.A., Lee J. Analysis and characterization of hepatitis B vaccine particles synthesized from *Hansenula polymorpha*. *Vaccine.* 2008;26:4138-4144. DOI 10.1016/j.vaccine.2008.05.070.
- Sibirny A.A. *Pichia methanolica* (*Pichia pinus* MH<sub>4</sub>). In: Wolf K. (Ed.). *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer, 1996;277-291. DOI 10.1007/978-3-642-79856-6\_8.
- Sohn M.J., Oh D.B., Kim E.J., Cheon S.A., Kwon O., Kim J.Y., Lee S.Y., Kang H.A.H. *HpYPS1* and *HpYPS7* encode functional aspartyl proteases localized at the cell surface in the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast.* 2012;29:1-16. DOI 10.1002/yea.1912.
- Spencer D.M., Spencer J.F.T., Fengler E., de Figueroa L.I. Yeasts associated with algarrobo trees (*Prosopis* spp.) in northwest Argentina: a preliminary report. *J. Ind. Microbiol.* 1995;14:472-474. DOI 10.1007/BF01573960.
- Spencer D.M., Spencer J.F.T., de Figueroa L.I., Garro O., Fengler E. Yeasts associated with pods and exudates of algarrobo trees (*Prosopis* spp.) and species of columnar cacti in northwest Argentina. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996;44(6):736-739. DOI 10.1007/BF00178611.
- Spencer J.F.T., Spencer D.M. Ecology: where yeasts live. In: Spencer J.F.T., Spencer D.M. (Eds.). *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Springer, 1997;33-58. DOI 10.1007/978-3-662-03370-8\_4.
- Syromyatnikov M.Y., Kiryanova S.V., Popov V.N. Development and validation of a TaqMan RT-PCR method for identification of mayonnaise spoilage yeast *Pichia kudriavzevii*. *AMB Express.* 2018;8(186). DOI 10.1186/s13568-018-0716-y.
- Tanapongpipat S., Promdonkoy P., Watanabe T., Tirasophon W., Roongsawang N., Chiba Y., Eurwilaichitr L. Heterologous protein expression in *Pichia thermomethanolica* BCC16875, a thermotolerant methylotrophic yeast and characterization of N-linked glycosylation in secreted protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 2012;334:127-134. DOI 10.1111/j.1574-6968.2012.02628.x.
- Trifinopoulos J., Nguyen L.T., von Haeseler A., Minh B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016;(44):W232-W235. DOI 10.1093/nar/gkw256.
- van der Klei I.J., Yurimoto H., Sakai Y., Veenhuis M. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1763(12):1453-1462. DOI 10.1016/j.bbamcr.2006.07.016.
- Wegner E.H. Biochemical Conversions by Yeast Fermentation at High Cell Densities. U.S. Pat. 4,414,329. Oct. 29, 1981.
- Wegner G.H., Harder W. Methylotrophic Yeasts – 1986. In: van Verseveld H.W., Duine J.A. (Eds.). *Microbial Growth on C<sub>1</sub> Compounds: Proc. of the 5th Int. Symp. Dordrecht: Springer Netherlands, 1987;131-138.* DOI 10.1007/978-94-009-3539-6\_17.
- Weydemann U., Keup P., Piontek M., Strasser A.W.M., Schweden J., Gellissen G., Janowicz Z.A. High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* – authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995;4:377-385. DOI 10.1007/BF00169932.
- Yamada Y., Maeda K., Mikata K. The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia* species, formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): the proposals of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994;58(7):1245-1257. DOI 10.1271/bbb.58.1245.
- Yamada Y., Matsuda M., Maeda K., Mikata K. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995;59(3):439-444. DOI 10.1271/bbb.59.439.
- Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. Characterization and high-level production of D-amino acid oxidase in *Candida boidinii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001;65(3):627-633. DOI 10.1271/bbb.65.627.
- Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism. *Chem. Rec.* 2005;5:367-375. DOI 10.1002/tr.20056.
- Yurimoto H., Komeda T., Lim C.R., Nakagawa T., Kondo K., Kato N., Sakai Y. Regulation and evaluation of five methanol-inducible promoters in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1493:56-63. DOI 10.1016/S0167-4781(00)00157-3.
- Yurimoto H., Sakai Y. Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2009;53:85-92. DOI 10.1042/ba20090030.
- Yurimoto H., Yamane M., Kikuchi Y., Matsui H., Kato N., Sakai Y. The pro-peptide of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase functions in *cis* and in *trans* to mediate efficient secretion of active enzyme from methylotrophic yeasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004;68(10):2058-2069. DOI 10.1271/bbb.68.2058.
- Zhang T., Gong F., Chi Z., Liu G., Chi Z., Sheng J., Li J., Wang X. Cloning and characterization of the inulinase gene from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and its expression in *Pichia pastoris*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2009;95:13-22. DOI 10.1007/s10482-008-9281-8.

#### ORCID ID

E.G. Pershina orcid.org/0000-0003-2658-7906  
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

**Благодарности.** Работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № 0259-2019-0005.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.10.2019. После доработки 15.11.2019. Принята к публикации 19.12.2019.