



Промоторы для высокоэффективной экспрессии и секреции проинсулина в *Saccharomyces cerevisiae*

Е.А. Буслаева[✉], З.Р. Хасаншина, И.А. Корнаков, М.П. Коробкина, В.И. Шмурак, Р.В. Драй

Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг», ул. Связи, д. 34, лит. А, пос. Стрельна, Санкт-Петербург, 198515, Российская Федерация

✉ Буслаева Евгения Александровна; Evgeniia.Buslaeva@geropharm.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Нехватка систематических сравнительных данных об активности промоторов в *Saccharomyces cerevisiae* является фактором, ограничивающим повышение эффективности биосинтеза рекомбинантного проинсулина человека. Настоящая работа направлена на экспериментальное сравнение активности ряда конститутивных промоторов в стандартных технологических условиях для определения наиболее продуктивного регуляторного элемента, применимого в промышленных штаммах-продуцентах.

ЦЕЛЬ. Оценить влияние промоторов *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3* (*GPD*), *TPI1* на экспрессию рекомбинантного проинсулина человека в *Saccharomyces cerevisiae* и ранжировать их по силе для выбора оптимального промотора, обеспечивающего максимальную продуктивность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Для экспрессии предшественника инсулина (проинсулина) человека использовали диплоидный штамм *S. cerevisiae* YS3, полученный слиянием гаплоидных клеток. Векторная система на основе плазмиды pRS425 включала в себя синтетические промоторы (*TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3*) и сигнальную последовательность. Конструкции вводили в клетки методом электропорации. Сравнительный анализ экспрессии белка проводили при культивировании *S. cerevisiae* YS3 в колбах и биореакторах с использованием среды YPD. Определение содержания проинсулина и этанола осуществляли с помощью спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и газовой хроматографии. Подтверждение экспрессии проводили методом ВЭЖХ, совмещенной с масс-спектрометрией. Статистическая обработка данных выполнялась при помощи дисперсионного и корреляционного анализов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Получены штаммы-продуценты *S. cerevisiae* YS3/pF1145 (*TPI1*), YS3/pF1157 (*TEF1*), YS3/pF1199 (*ADH2*), YS3/pF1200 (*ALD4*), YS3/pF1201 (*TDH3*), и проведено сравнение уровня экспрессии рекомбинантного белка. Штамм YS3/pF1201, в котором экспрессия проинсулина находилась под контролем промотора *TDH3*, обладал максимальной продуктивностью (15,51±0,57 мг/л). В процессе ферментации в лабораторных биореакторах продуктивность штамма YS3/pF1201 (*TDH3*) достигла 139,17 мг/л через 72 ч культивирования при значении биомассы 154,50 г/л.

ВЫВОДЫ. Промоторы для экспрессии проинсулина в клетках *S. cerevisiae* можно распределить по их силе в следующем порядке: *TDH3*~*ALD4*>*ADH2*>*TEF1*>*TPI1*. В процессе ферментации при использовании промотора *TDH3* достигнута продуктивность, превышающая в 6,1 раза продуктивность штамма-продуцента с классическим промотором *TPI1*, который используется для экспрессии проинсулина.

Ключевые слова: проинсулин; дрожжи; *Saccharomyces cerevisiae*; рекомбинантные белки; ферментация; плазмиды; экспрессия; конститутивный промотор; биореакторы

Для цитирования: Буслаева Е.А., Хасаншина З.Р., Корнаков И.А., Коробкина М.П., Шмурак В.И., Драï Р.В. Промоторы для высокоэффективной экспрессии и секреции проинсулина в *Saccharomyces cerevisiae*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):258–270. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-258-270>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ».
Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Promoters for high-efficiency expression and proinsulin secretion in *Saccharomyces cerevisiae*

Eugenia A. Buslaeva✉, Zukhra R. Khasanshina, Igor A. Kornakov, Mariya P. Korobkina, Vladimir I. Shmurak, Roman V. Draï

Pharmholding CJSC, 34 Svyazi St., Strelna, St Petersburg 198515, Russian Federation

✉ Evgeniia A. Buslaeva; Evgeniia.Buslaeva@geropharm.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. The lack of systematic research comparing promoter activity in *Saccharomyces cerevisiae* limits approaches to improving the efficiency of recombinant human proinsulin biosynthesis. This study compared the activity of constitutive promoters under standardised technological conditions to identify the most productive regulatory elements for application in industrial strains.

AIM. This study aimed to compare the influence of *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3* (*GPD*), and *TPI1* promoters on recombinant proinsulin expression in *Saccharomyces cerevisiae* and rank their effectiveness for selecting a highly productive promoter.

MATERIALS AND METHODS. *S. cerevisiae* YS3 diploid strain obtained by haploid cells fusion was used for proinsulin expression. The vectors based on the pRS425 plasmid consisted of synthetic promoters (*TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3*) and signal sequence. Plasmids were electroporated in the cell. Comparative expression analysis was performed by cultivating *S. cerevisiae* YS3 in flasks and bioreactors using YPD media. Proinsulin and ethanol concentration was measured using spectrophotometry, HPLC, and gas chromatography. The expression was confirmed using HPLC-MS. Statistical analysis included variance and correlation analysis.

RESULTS. Strains *S. cerevisiae* YS3/pF1145 (*TPI1*), YS3/pF1157 (*TEF1*), YS3/pF1199 (*ADH2*), YS3/pF1200 (*ALD4*), and YS3/pF1201 (*TDH3*) were obtained, then expressions of recombinant protein were compared. The strain YS3/pF1201 that had proinsulin expression controlled by the promoter *TDH3* showed a maximum productivity of 15.51±0.57 mg/L. When fermented in laboratory bioreactors, the strain YS3/pF1201 achieved a productivity of 139.17 mg/L and a biomass of 154.5 mg/L after 72 hours of cultivation.

CONCLUSIONS. Analysis of experimental data ranked the promoters for proinsulin expression in *S. cerevisiae* cells by their effectiveness: *TDH3*~*ALD4*>*ADH2*>*TEF1*>*TPI1*. During the fermentation, *TDH3* promoter showed significantly higher productivity, which was 6.1 times more than in the classical strain with the *TPI1* promoter for proinsulin expression.

Keywords: proinsulin; yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; recombinant proteins; fermentation; plasmids; expression; constitutive promoter; bioreactors

For citation: Buslaeva E.A., Khasanshina Z.R., Kornakov I.A., Korobkina M.P., Shmurak V.I., Draï R.V. Promoters for high-efficiency expression and proinsulin secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):258–270. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-258-270>

Funding. The work was financially supported by GEROPHARM.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Список сокращений

ADH2 — ген алкогольдегидрогеназы II;
Adr1 — регулятор синтеза алкогольдегидрогеназы II;
ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6 — гены альдегиддегидрогеназ 2–6;
ANOVA — дисперсионный анализ;
DHAP — дигидроксиацетонфосфат;
eEF1 — фактор элонгации трансляции 1;
GPEB — потенцирующий связывание с *GRF1*-сайтом элемент-связывающий белок;
GRAS — общепризнанные как безопасные;
GRF1 — общий регуляторный фактор 1;
Msn2, Msn4 — мультикопийные супрессоры мутации *SNF1*, белки 2 и 4;
RAP1 — белок-активатор репрессора 1;
RPG — гены рибосомных белков;
STRE — элементы реакции на стресс;

TDH3 (GPD) — ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы;
TEF1 — ген фактора элонгации трансляции 1;
TPI1 — ген триозофосфатизомеразы 1;
TUF — трансляционный, находящийся перед геном, фактор;
UAS — активирующая нуклеотидная последовательность перед геном;
UASrpg — активирующая нуклеотидная последовательность перед генами рибосомных белков;
YPD — питательная среда, содержащая дрожжевой экстракт, пептон и декстрозу;
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;
ВЭЖХ-МС — жидкостная хромато-масс-спектрометрия;
СЭ — система экспрессии;
УФ-излучение — ультрафиолетовое излучение.

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтические белки вследствие специфичности, эффективности и безопасности приобретают все большее значение в профилактике и лечении заболеваний. С появлением технологии рекомбинантной ДНК для получения терапевтических белков используются различные системы экспрессии (СЭ) в бактериях, дрожжах, растениях и клетках млекопитающих [1–3]. В отличие от СЭ, в клетках млекопитающих дрожжи растут на недорогих питательных средах и легко поддаются генетическим манипуляциям. В отличие от прокариотической СЭ, дрожжевые клетки обладают эффективной системой секреции, что дает возможность получить правильно свернутый белок с большинством посттрансляционных модификаций, типичных для эукариотических клеток, и проводить менее затратную очистку целевого белка. Дрожжевые клетки не восприимчивы к фагам и эукариотическим вирусам, что является большим преимуществом для фармацевтической промышленности¹ [4]. Наиболее часто используемыми дрожжевыми клетками являются *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* и штаммы *Kluyveromyces* [4–6].

Вид *S. cerevisiae* является пионером среди дрожжей в получении рекомбинантных белков. Для редактирования полностью расшифрованного генома и метаболической инженерии штаммов *S. cerevisiae* доступно множество молекулярно-генетических инструментов [7], что делает *S. cerevisiae* перспективной системой экспрессии для получения различных рекомбинантных белков [8]. *S. cerevisiae* имеет статус GRAS, что ускоряет одобрение регуляторными

органами продуктов, полученных из дрожжей, и снимает ряд нормативных барьеров в процессе разработки биофармацевтических продуктов.

Таким образом, создание универсального дрожжевого штамма-производителя, соответствующего требованиям регуляторных органов и пригодного для производства различных рекомбинантных белков, остается актуальной задачей биотехнологии, так как единая платформа позволит сократить объем исследований и ускорит процесс выведения продукта на фармацевтический рынок.

Один из ключевых факторов, определяющих эффективность промышленного производства терапевтических белков — это высокая продуктивность штамма-производителя [9]. Количество синтезируемого рекомбинантного белка тесно коррелирует с удельной скоростью роста клеток, зависит от правильного сворачивания полипептидной цепи, дальнейшего перемещения белка внутри клетки и последующей секреции [6, 10]. В дрожжевых СЭ выбор источника углерода существенно влияет на продуктивность, при этом степень воздействия определяется характеристиками используемого промотора [11]. В большинстве случаев в СЭ, основанных на *S. cerevisiae*, применяются конститутивные промоторы, обеспечивающие стабильную экспрессию белка независимо от условий культивирования. Наиболее используемыми промоторами являются промоторы *TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4* и *TDH3 (GPD)* [12–22].

Ген *TPI* кодирует гликолитический фермент триозофосфат-изомеразу. Промотор *TPI1* содержит консервативную последовательность ACCCATCA, которая гомологична консенсусным

¹ Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use. ICH Q5A(R2). Geneva; 2022.

сайтам связывания регуляторных белков GRF1, RAP1 и TUF, а также обнаруживает сходство с регуляторными элементами других генов гликолитического пути. Наличие такой последовательности может объяснить высокий уровень экспрессии данного гена [23]. Штаммы с удаленным *TPI* не способны метаболизировать глюкозу [24].

Ген *TEF1* в *S. cerevisiae* отвечает за биосинтез eEF1 [25]. Комплекс eEF1 играет центральную роль в синтезе белка, доставляя аминокил-тРНК к рибосоме в процессе элонгации [26]. Гены *TEF* принадлежат к большому семейству генов *RPG*, кодирующих компоненты аппарата трансляции, которые скоординированно регулируются. Большинство дрожжевых *RPG* содержат UASrpg [27].

Ген алкогольдегидрогеназы 2 (*ADH2*) — один из многих генов дрожжей, экспрессия которых регулируется в зависимости от присутствия глюкозы в среде. Промотор *ADH2* очень удобен для использования при экспрессии гетерологичных генов, поскольку он обеспечивает сильный сигнал начала транскрипции, и транскрипция с промотора *ADH2* значимо подавляется в присутствии глюкозы в среде [28].

Цитозольные изоформы альдегиддегидрогеназы дрожжей кодируются генами *ALD2*, *ALD3* и *ALD6*, тогда как митохондриальные — генами *ALD4* и *ALD5* [29].

Элементы *STRE* и факторы транскрипции Msn2 и Msn4, по-видимому, опосредуют активацию генов в ответ на различные стрессы (тепловой шок, окислительный и осмотический стрессы), повреждение ДНК и голодание [30].

Продукт гена *GPD* (глицерин-3-фосфатдегидрогеназа) катализирует NADH-зависимое превращение DHAP в глицерин-3-фосфат. Активность промотора *GPD*, обусловленная двумя изоферментами Gpd1p и Gpd2p, важна для роста клеток в анаэробных условиях. Промотор гена *GPD* является самым сильным среди конститутивных промоторов *S. cerevisiae* [31–33].

Результаты сравнительных исследований влияния промоторов на экспрессию различных модельных белков (α -амилаза, сывороточный альбумин человека, зеленый флуоресцентный белок) описаны в работах [34–36]. На эффективность экспрессии влияет не только промотор, но и сам экспрессируемый белок [13, 21, 37–39]. На основании имеющихся данных не представляется возможным сделать однозначный вывод о превосходстве какого-либо типа промотора в отношении эффективности экспрессии гетерологичных белков в системе *S. cerevisiae*. Следовательно, актуально проведение сравнительного анализа по оценке влияния

промоторов на экспрессию различных рекомбинантных белков. Стоит отметить, что подобное исследование не проводилось в отношении большинства терапевтических белков, экспрессируемых в дрожжевых системах экспрессии. В частности, изучено влияние нескольких промоторов на экспрессию проинсулина, но сравнительный анализ различных промоторов в рамках одного исследования не проводился [40]. Использование промоторной последовательности *TPI1* для контроля экспрессии позволяет достичь продуктивности 80 мг/л [8, 41, 42] и 112 мг/л [43]. Использование промотора *CIT1* привело к увеличению выхода проинсулина на 80% в сравнении с контролем (промотор *TPI1*) [44]. При использовании промотора *TPI1* удалось достичь максимального выхода проинсулина (90 мг/л), в то время как в случае промотора *TEF1* выход составлял 2,5 мг/л [36].

Результаты проведенных исследований не позволяют с уверенностью ранжировать промоторы по транскрипционной активности для экспрессии проинсулина, потому что уровень экспрессии зависит от транскрипционной и трансляционной регуляции. В связи с этим при конструировании дрожжевых штаммов-продуцентов значение имеет рациональный подбор генетических элементов СЭ для достижения максимальной продуктивности.

Нами было выбрано пять промоторов: *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3 (GPD)*, *TPI1*, которые чаще всего используются для экспрессии рекомбинантных белков в дрожжах. Выбор этих промоторов обусловлен доказанной эффективностью применения в биотехнологии, что позволяет провести обоснованное сравнение их эффективности в контексте экспрессии терапевтических белков и выявить наиболее подходящие промоторы для дальнейших исследований.

Цель работы — оценить влияние промоторов *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3 (GPD)*, *TPI1* на экспрессию рекомбинантного проинсулина человека в *Saccharomyces cerevisiae* и ранжировать их по силе для выбора оптимального промотора, обеспечивающего максимальную продуктивность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали диплоидный штамм *Saccharomyces cerevisiae* YS3, который был получен путем слияния гаплоидных клеток *S. cerevisiae* (*MAT α pep4::HIS3 prb1-delta1.6R his3-delta200 ura3-52 gal2 can1 tpi::URA3*) и *S. cerevisiae* (*MAT α ura3-52 trp1 lys2-801 leu2-delta1 his3-delta200 pep4::HIS3 prb1-delta1.6R can1 GAL tpi::KanR*).

В качестве вектора для создания экспрессионных конструкций использовали челночную плазмиду pRS425 (ATCC, США), содержащую маркер устойчивости к ампициллину, а также точки начала репликации (ориджин) pUC и 2- μ m (рис. 1). Ген предшественника человеческого инсулина с сигнальным пептидом был синтезирован искусственно (ATUM, США) и клонирован в вектор с использованием рестрикционных сайтов *Sall* и *SpeI*. Последовательности промоторов и терминаторов транскрипции были получены синтетическим путем (ATUM, США). Последовательности промотора и терминатора гена *TPI1* были клонированы рестрикционно-лигазным методом с использованием рестриктаз *SacI* и *BamHI*; последовательность промотора *TEF1* – *SacI/BglII*; *ADH2* – *BspMI/BglII*; *ALD4* и *TDH3* – *SacI/BglII*.

Трансформацию штамма-хозяина YS3 плазмидой проводили с помощью электропорации [45]. В итоге были получены штаммы-продуценты *S. cerevisiae* YS3/pF1145, YS3/pF1157, YS3/pF1199, YS3/pF1200, YS3/pF1201, содержащие промоторы *TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3* соответственно. Из-за наличия ориджина 2- μ m плазмиды реплицировались в клетках дрожжей без интеграции в геном. Для верификации сконструированных штаммов проводили амплификацию целевых участков методом ПЦР и последующее секвенирование (ЗАО «Евроген», Россия).

Методы

Культивирование штаммов-продуцентов *S. cerevisiae* в колбах.

В экспериментах использовали стандартную жидкую питательную среду YPD1, содержащую 1% глюкозы [46], а для получения посевного материала – агаризованную среду YPD2, содержащую 2% глюкозы [46]. Инкубацию на агаризованной среде YPD2 проводили в термостате при 30 °C в течение 72 ч. Сформированные колонии смывали жидкой средой YPD1 и переносили в стерильные колбы объемом 100 мл, которые содержали 15 мл той же среды. Культуры инкубировали в среде YPD1 при 30 °C и перемешивании при 210 об/мин в течение 42 ч. В точках роста 18, 24 и 42 ч проводили отбор проб для измерения оптической плотности, содержания белка и этанола в культуральной жидкости.

Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре NanoPhotometer P300 (Implen, Германия). Начальная оптическая плотность клеток при инокуляции составила 0,2–0,5 при длине волны 600 нм.

Уровень глюкозы контролировали с помощью глюкометра Contour TS (Ascensia Diabetes Care, Швейцария) и при необходимости доводили концентрацию глюкозы до 1% с помощью 40%-го рабочего раствора глюкозы.

Подготовка посевного материала для ферментации в биореакторе. В качестве исходного

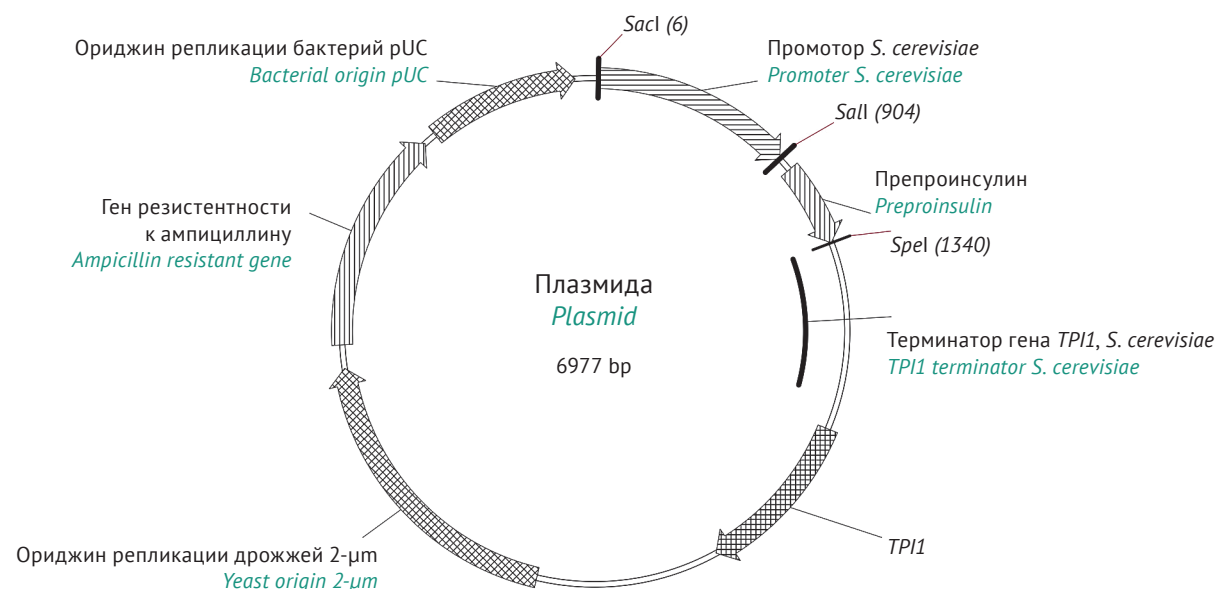


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения Vector NTI 10 (Thermo Fisher Scientific, США) / The figure is prepared by the authors using their own data on Vector NTI 10 software (Thermo Fisher Scientific, USA)

Рис. 1. Схема экспрессионной конструкции на основе вектора pRS425 с клонированными альтернативными промоторами и терминаторами транскрипции.

Fig. 1. Expression construct based on the pRS425 vector with cloned alternative promoters and transcription terminators.

материала для подготовки посевной культуры использовали предварительные клеточные банки штаммов YS3/pF1145 (*TPI1*) и YS3/pF1145 (*TDH3*). Клетки инокулировали в 300 мл жидкой среды соответствующего состава без добавления глюкозы [41] и инкубировали при 30 ± 1 °C в шейкер-инкубаторе Ecotron (Infors HT, Швейцария) при 210 об/мин в течение 66–72 ч.

Культивирование в биореакторе. Основной этап культивирования штаммов-продуцентов проводили в течение 96 ч в лабораторных ферментерах Multifors (Infors HT, Швейцария). Состав питательной среды и параметры процесса были выбраны на основе ранее выполненной оптимизации с использованием методологии Design of Experiments для дрожжевых СЭ [41]. Во время ферментации периодически отбирали пробы культуральной жидкости для определения содержания клеточной биомассы, этанола и проинсулина.

Определение массы влажного осадка клеток проводили следующим образом: 2 мл клеточной суспензии переносили в заранее тарированные микропробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 15000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5424 (Eppendorf, Германия). Супернатант переносили в чистые пробирки для дальнейшего определения содержания этанола и проинсулина.

Определение молекулярной массы рекомбинантного проинсулина в культуральной жидкости проводили методом ВЭЖХ-МС, используя систему Acquity UPLC (Waters, США) с масс-спектрометрическим детектором. Разделение компонентов проводили на колонке SunFire™ C18 (5 мкм, 150×4,6 мм) (Waters, США) с регистрацией сигнала при длине волны 214 нм.

В качестве подвижных фаз использовали фазу А (89,9% вода, 10% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) и фазу В (99,9% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота). Поток подвижной фазы поддерживали на уровне 0,9 мл/мин. Элюирование проводили в градиентном режиме: увеличение концентрации фазы В от 0 до 75% за 18 мин, затем от 75 до 100% за 1 мин с последующим возвращением к исходному составу за 1 мин.

Детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации с анализом массы ионов в диапазоне 300–3000 m/z. Каждую серию анализов начинали и завершали введением холостой пробы, в качестве которой использовалась вода для хроматографии, в целях предотвращения перекрестной контаминации. В качестве контрольного образца использовали референсный стандарт инсулина (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Определение содержания проинсулина в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ с использованием системы Acquity UPLC (Waters, США), оснащенной диодно-матричным детектором. Разделение компонентов проводили на колонке SunFire™ C18 (5 мкм, 150×4,6 мм) (Waters, США) с регистрацией сигнала при длине волны 214 нм. В качестве фазы А использовали 3% водный раствор натрия перхлората моногидрата, фазы В – 78% ацетонитрил. Хроматографирование проводили при скорости потока 0,9 мл/мин с использованием градиентной программы: увеличение концентрации фазы В от 20 до 40% за 20 мин, затем от 40 до 95% за 5 мин с последующим возвращением к исходному составу за 1 мин. Количественное определение проводили по калибровочному графику. Калибровка была произведена с использованием стандартного образца инсулина (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Анализ внеклеточного метаболита этанола в культуральной жидкости проводили методом газовой хроматографии с использованием хроматографа Agilent 7890A (Agilent Technologies, США), оборудованного пламенно-ионизационным детектором, системой парового ввода проб (Agilent 7694E), а также капиллярной колонкой HP FFAP (50 м×0,32 мм×0,5 мкм). Калибровка была произведена с использованием стандартного раствора изопропанола (ООО «Экротекс», Россия) с чистотой $\geq 99,5\%$.

Для анализа в паровые флаконы объемом ~10 мл вносили 1,7 мл предварительно размороженной культуральной жидкости, после чего флаконы герметично закрывали металлическими крышками с силиконовыми прокладками. Пробы инкубировали в пробоотборнике при 85 °C в течение 15 мин, после чего осуществляли забор паровой фазы и ее введение в хроматограф.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США). Для выявления статистически значимых различий между штаммами по анализируемым показателям применяли дисперсионный анализ. Взаимосвязи между количественными параметрами оценивали с помощью парного корреляционного анализа по методу Пирсона отдельно для каждого исследуемого штамма. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение штаммов-продуцентов проинсулина

Были получены дрожжевые штаммы-продуценты *S. cerevisiae* YS3/pF1145, YS3/pF1199,

YS3/pF1157, YS3/pF1200, YS3/pF1201, в которых экспрессия проинсулина находилась под контролем дрожжевых нативных конститутивных промоторов *TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3* соответственно.

Подтверждение подлинности продукта проводилось с использованием ВЭЖХ-МС. Экспериментальная масса проинсулина, обнаруженная в культуральной жидкости, имела то же значение, что и экспериментальная масса стандартного образца (рис. 2). Так как аминокислотная последовательность проинсулина не имеет сайтов гликозилирования, на хроматограммах отсутствовали различающиеся по массе гликоформы.

Анализ показателей продуктивности и роста штаммов-продуцентов проинсулина

В рамках предварительной оценки полученных штаммов при культивировании в колбах исследовали параметры роста биомассы, накопления этанола и рекомбинантного белка. В качестве контроля использовался штамм YS3/pF1145, экспрессия проинсулина в котором находилась под контролем промотора *TPI1*. Последовательность данного промотора является «золотым стандартом» для экспрессии рекомбинантных белков в *S. cerevisiae* [36].

Оценка накопления биомассы штаммами-продуцентами. На рисунке 3 представлена динамика накопления биомассы различными штаммами-продуцентами при культивировании в течение 42 ч.

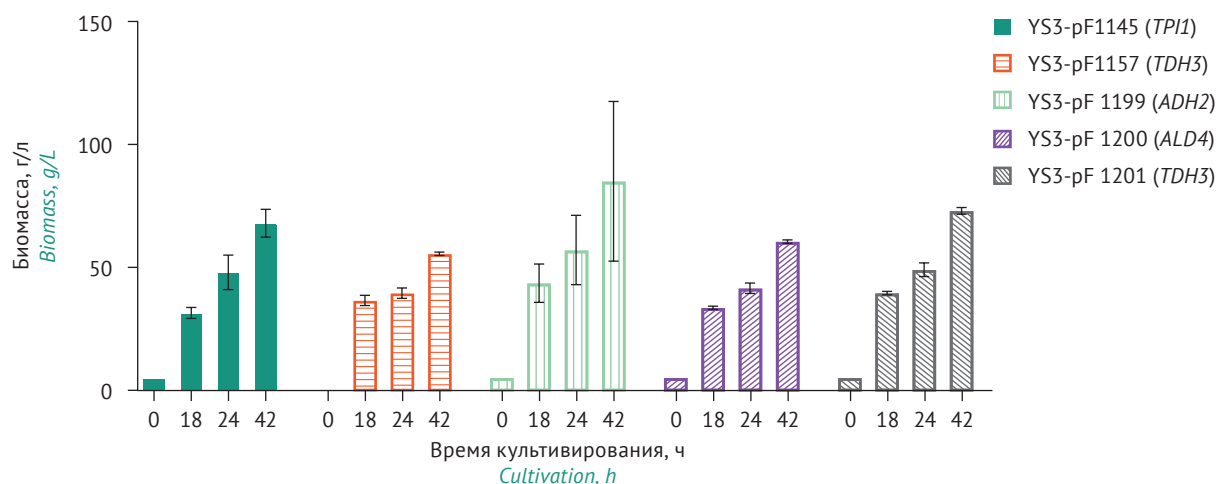


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США) / The figure is prepared by the authors using their own data on GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., USA)

Рис. 3. Динамика роста биомассы различных штаммов-продуцентов *S. cerevisiae* при культивировании в течение 42 ч. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Средние значения нормированы относительно значений в точке «18 ч» (штамм YS3/pF1145).

Fig. 3. Wet cell accumulation dynamics of different *S. cerevisiae* producer strains during 42-hour cultivation. The data are represented as the mean value $\pm$ standard deviation ($n=3$). The mean values are normalised to the 18-hour time point of strain YS3/pF1145.

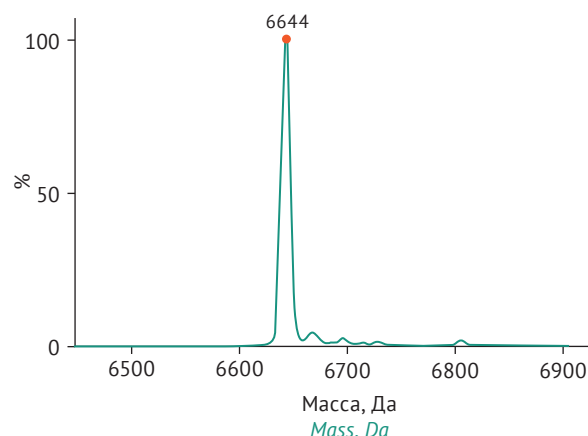


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения UniDec v.5.0.1 [47] / The figure is prepared by the authors using their own data on UniDec software v.5.0.1 [47]

Рис. 2. Пример типового ВЭЖХ-МС спектра образца культуральной жидкости штаммов-продуцентов проинсулина *S. cerevisiae*. По оси X обозначена масса проинсулина (Да), по оси Y — относительная интенсивность сигнала (% от максимального значения). Оригинальное изображение спектра экспортировано из программы UniDec v.5.0.1.

Fig. 2. Example of typical HPLC-MS of a sample spectrum of cultural medium from proinsulin *S. cerevisiae* producer strains. X-axis, proinsulin mass (Da); Y-axis, relative signal intensity (% of the maximal value). The original image was imported from UniDec software v.5.0.1.

Анализ результатов показал, что все исследуемые штаммы-продуценты демонстрировали схожую динамику роста на протяжении всего процесса культивирования в колбах. Штаммы различались по титру клеток через 42 ч культивирования при одинаковой плотности посева

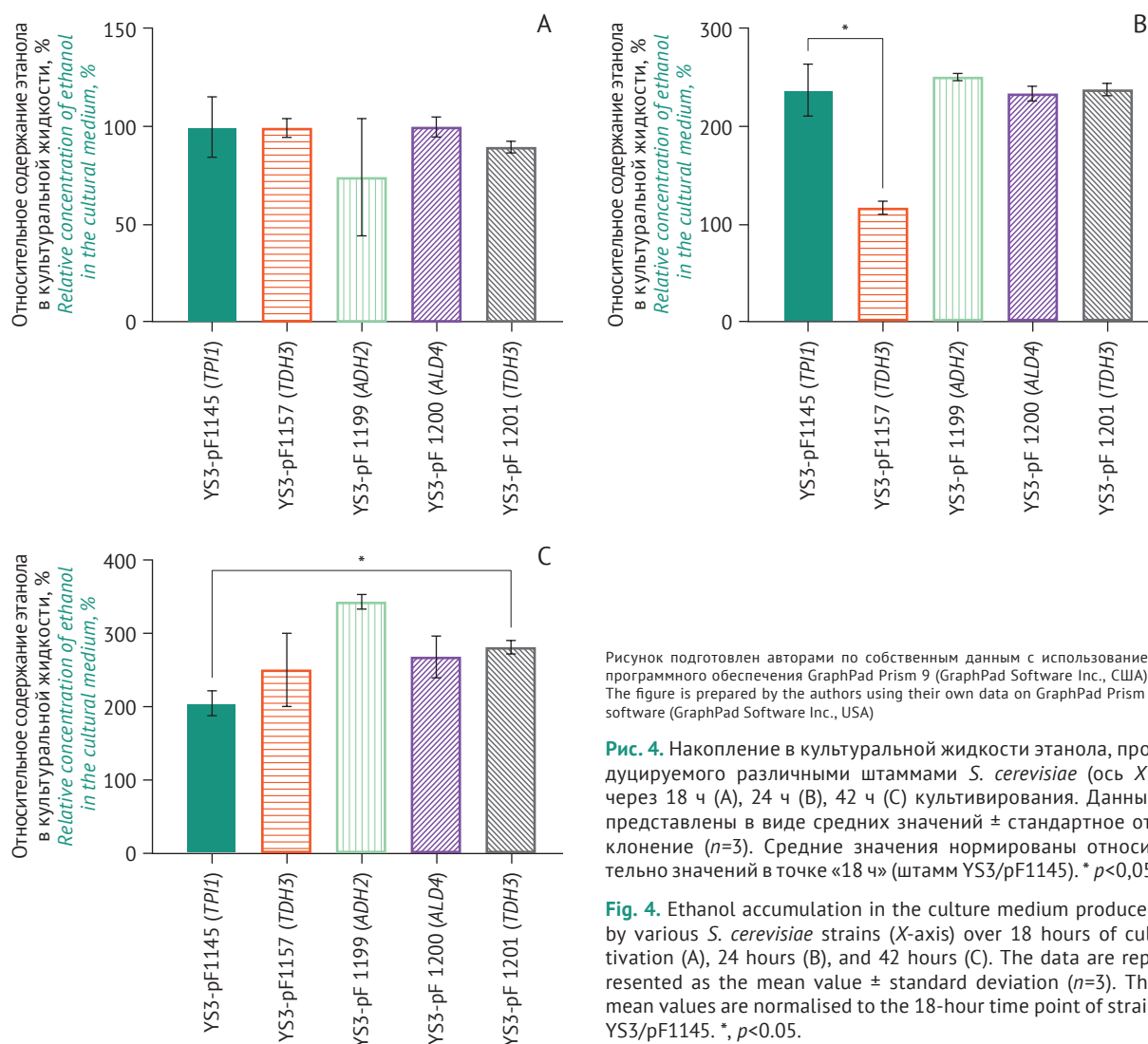


Рис. 4. Накопление в культуральной жидкости этанола, продуцируемого различными штаммами *S. cerevisiae* (ось X), через 18 ч (A), 24 ч (B), 42 ч (C) культивирования. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Средние значения нормированы относительно значений в точке «18 ч» (штамм YS3/pF1145). * $p<0.05$.

Fig. 4. Ethanol accumulation in the culture medium produced by various *S. cerevisiae* strains (X-axis) over 18 hours of cultivation (A), 24 hours (B), and 42 hours (C). The data are represented as the mean value $\pm$ standard deviation ($n=3$). The mean values are normalised to the 18-hour time point of strain YS3/pF1145. *, $p<0.05$.

(5 г/л). Штаммы-продуценты YS3/pF1201 (*TDH3*) и YS3/pF1145 (*TPI1*) через 42 ч культивирования накапливали биомассу ≈ 35 г/л; YS3/pF1200 (*ALD4*) и YS3/pF1157 (*TEF1*) – ≈ 30 г/л; YS3/pF1199 (*ADH2*) – 42 г/л. Значения биомассы штамма-продуцента YS3/pF1199 (*ADH2*) значительно варьировались в двух точках (24 и 42 ч), что, возможно, связано с некоторой разницей плотности посева клеток.

Оценка накопления этанола штаммами-продуцентами. На рисунке 4 представлена сравнительная оценка накопления этанола различными штаммами-продуцентами в ходе культивирования. Все измеренные значения были нормированы по отношению к штамму YS3/pF1145 (*TPI1*) на соответствующем временном интервале.

Практически все штаммы-продуценты (рис. 4) увеличивали содержание этанола в культуральной жидкости. Самые низкие значения содержания этанола через 42 ч культивирования наблюдались для контрольного штамма-продуцента

YS3/pF1145 (*TPI1*), тогда как максимальное накопление этанола было характерно для YS3/pF1199 (*ADH2*) через 42 ч культивирования и составляло 0,96% (табл. 1). Через 42 ч культивирования содержание этанола составило 0,7–0,8% в случаях остальных штаммов-продуцентов. *t*-тест показал, что статистически значимых различий между штаммами по накоплению этанола не наблюдалось. Для штамма-продуцента YS3/pF1157 (*TEF1*) накопление биомассы коррелировало с содержанием этанола в среде ($p=0,032$).

Оценка накопления проинсулина штаммами-продуцентами. Уровни накопления проинсулина, продуцируемого различными штаммами-продуцентами (измеренные значения пересчитаны относительно YS3/pF1145 (*TPI1*) для каждой временной точки при культивировании), показаны на рисунке 5.

Наименьшие значения удельной продуктивности в сравнении с остальными штаммами были характерны для контрольного

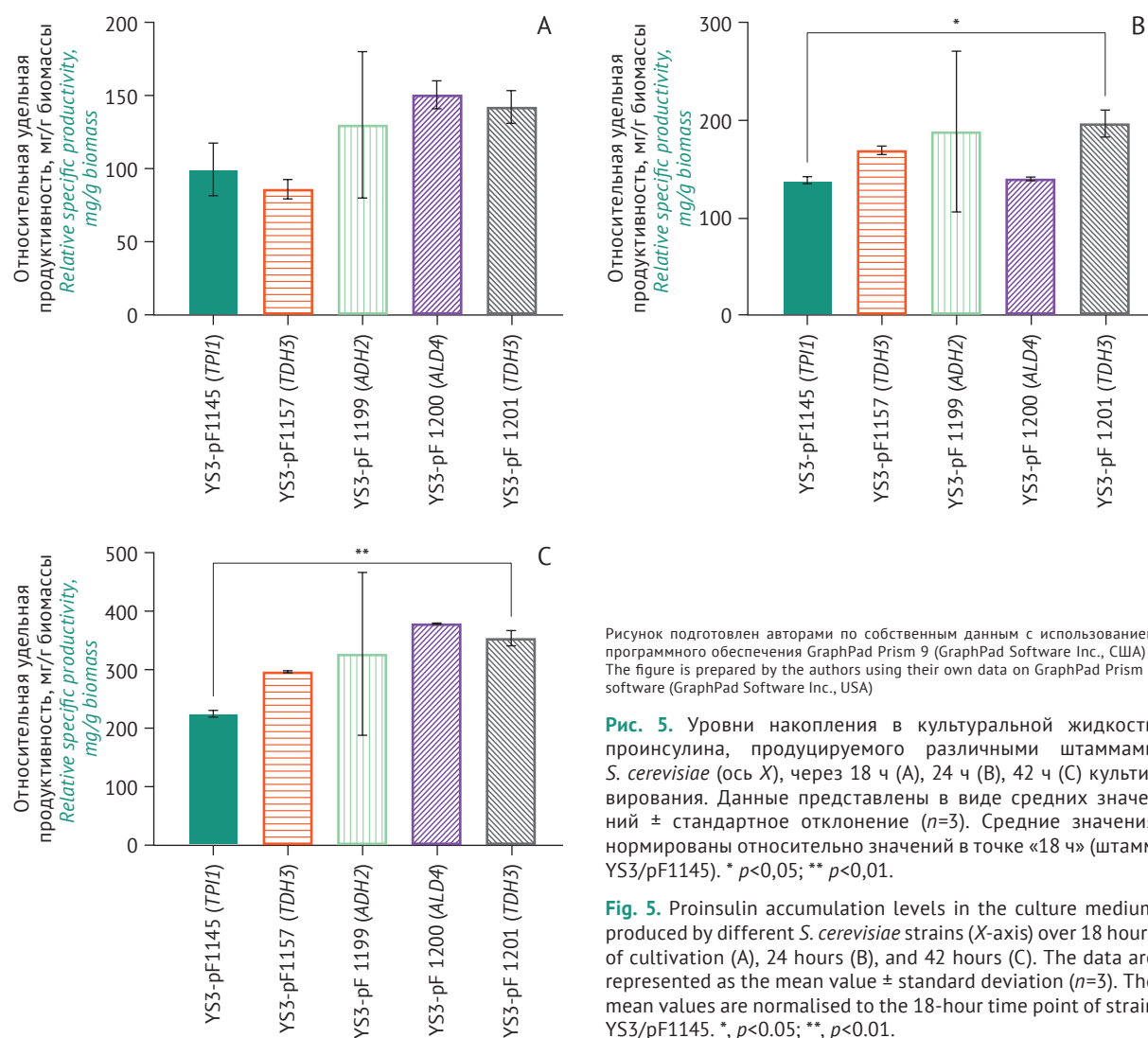


Рис. 5. Уровни накопления в культуральной жидкости проинсулина, продуцируемого различными штаммами *S. cerevisiae* (ось X), через 18 ч (А), 24 ч (В), 42 ч (С) культивирования. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Средние значения нормированы относительно значений в точке «18 ч» (штамм YS3/pF1145). * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Fig. 5. Proinsulin accumulation levels in the culture medium produced by different *S. cerevisiae* strains (X-axis) over 18 hours of cultivation (A), 24 hours (B), and 42 hours (C). The data are represented as the mean value $\pm$ standard deviation ($n=3$). The mean values are normalised to the 18-hour time point of strain YS3/pF1145. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$.

штамм YS3/pF1145 (*TPI1*) через 42 ч культивирования. Максимальный выход проинсулина у штамма-продуцента YS3/pF1200 (*ALD4*) составил $16,59 \pm 0,02$ мг/л (табл. 1) при $0,55 \pm 0,01$ мг/г биомассы через 42 ч культивирования. Штамм YS3/pF1201 (*TDH3*) при объемной продуктивности $15,51 \pm 0,57$ мг/л характеризовался низкой

удельной продуктивностью ($0,43 \pm 0,02$ мг/г биомассы), тогда как штамм YS3/pF1157 (*TEF1*) при низкой объемной продуктивности $12,98 \pm 0,08$ мг/л характеризовался высокой удельной продуктивностью ($0,470 \pm 0,003$ мг/г биомассы). Большая величина стандартного отклонения уровней накопления биомассы и целевого

Таблица 1. Сравнение продуктивности и характеристик роста штаммов-продуцентов проинсулина *S. cerevisiae*
Table 1. Comparison of productivity and growth characteristics of proinsulin *S. cerevisiae* producer strains

Штамм Strain	Промотор Promoter	Накопление биомассы, г/л Biomass accumulation, g/L	Содержание проинсулина, мг/л Proinsulin content, mg/L	Содержание этанола, % Ethanol content, %
YS3/pF1145	<i>TPI1</i>	$34,00 \pm 2,83$	$9,85 \pm 0,25$	$0,58 \pm 0,05$
YS3/pF1157	<i>TEF1</i>	$27,75 \pm 0,35$	$12,98 \pm 0,08$	$0,70 \pm 0,14$
YS3/pF1199	<i>ADH2</i>	$42,50 \pm 16,26$	$14,32 \pm 6,11$	$0,96 \pm 0,03$
YS3/pF1200	<i>ALD4</i>	$30,25 \pm 0,35$	$16,59 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,08$
YS3/pF1201	<i>TDH3</i>	$36,50 \pm 0,71$	$15,51 \pm 0,57$	$0,79 \pm 0,03$

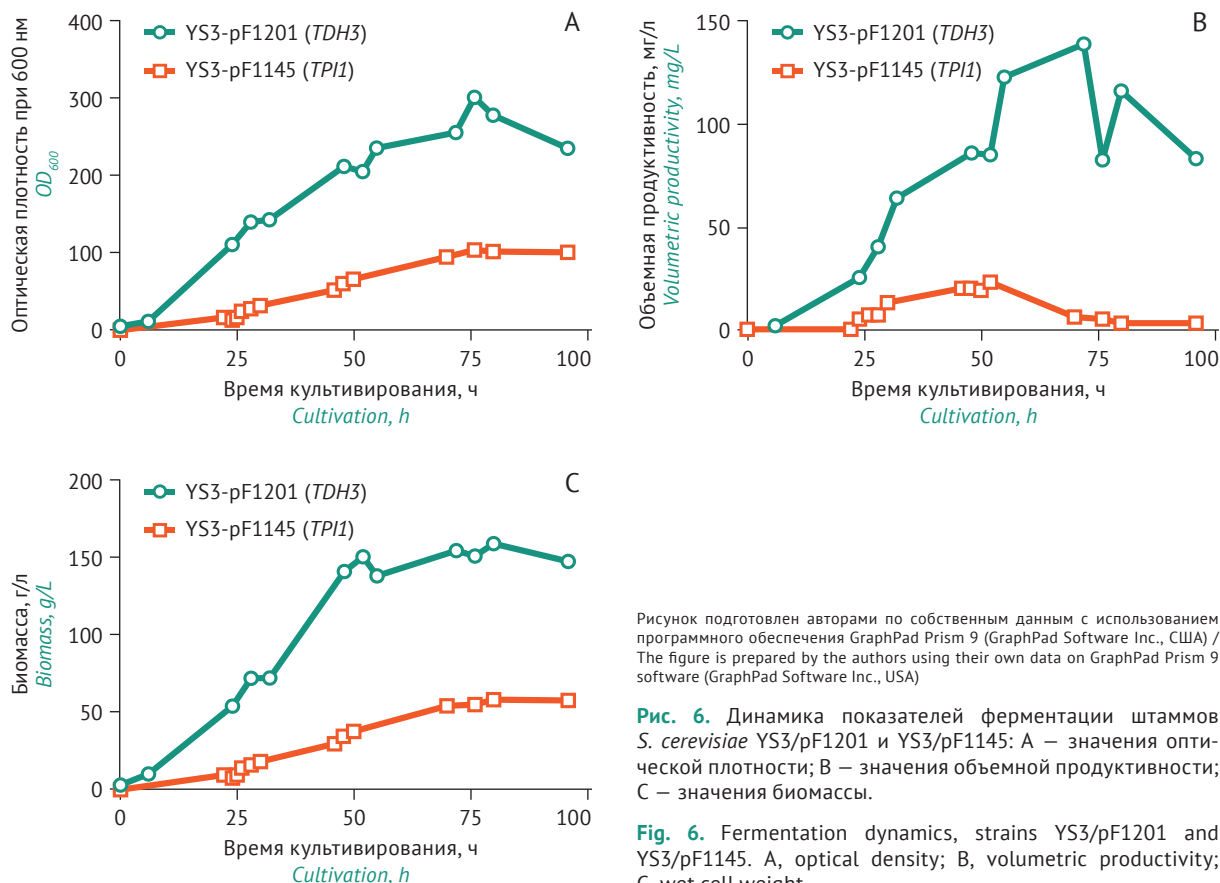


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США) / The figure is prepared by the authors using their own data on GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., USA)

Рис. 6. Динамика показателей ферментации штаммов *S. cerevisiae* YS3/pF1201 и YS3/pF1145: А – значения оптической плотности; В – значения объемной продуктивности; С – значения биомассы.

Fig. 6. Fermentation dynamics, strains YS3/pF1201 and YS3/pF1145. A, optical density; B, volumetric productivity; C, wet cell weight.

продукта (проинсулин) для штамма-продуцента YS3/pF1199 (*ADH2*), возможно, связана с некоторой разницей плотности посева клеток.

Для штаммов-продуцентов YS3/pF1199 (*ADH2*) и YS3/pF1201 (*TDH3*) отмечена зависимость между выходом рекомбинантного проинсулина и накоплением биомассы ($p=0,020$ и $p=0,019$ соответственно). Однако для всех штаммов-продуцентов не наблюдалось статистически значимой корреляции между выходом проинсулина и содержанием этанола или накоплением биомассы. Сравнение показателей продуктивности и характеристик роста исследуемых штаммов на момент завершения культивирования представлено в таблице 1.

Согласно полученным экспериментальным данным, промоторы по их силе для экспрессии проинсулина можно распределить в следующем ряду: *TDH3* $\approx$ *ALD4* $>$ *ADH2* $>$ *TEF1* $>$ *TPI1* (табл. 1). По данным литературы, промотор *TDH3* считается одним из самых сильных, однако ранее это не было показано для проинсулина [31–33]. Экспрессия проинсулина под контролем промотора *TEF1* была ниже по сравнению с *TPI1*, что объяснялось высокой скоростью распада мРНК [36]. Такое расхождение с данными литературы может быть обусловлено влиянием других структурных

элементов экспрессионной конструкции и особенностями проведения эксперимента.

Таким образом, для дальнейшей работы был выбран штамм YS3/pF1201 (*TDH3*) по причине его высокой продуктивности и благоприятной динамики накопления биомассы. Штамм YS3/pF1200 (*ALD4*) характеризовался не меньшей продуктивностью, но низким уровнем накопления биомассы.

Исследование ферментации штаммов-продуцентов в лабораторном биореакторе

Для штамма YS3/pF1201 (*TDH3*) был получен предварительный банк клеток и проведена ферментация в лабораторном биореакторе. В качестве контроля была поставлена ферментация штамма YS3/pF1145 (*TPI1*) в аналогичных условиях. Результаты, полученные в процессе ферментации, представлены на рисунке 6.

Стационарная фаза роста штамма YS3/pF1201 (*TDH3*) наблюдалась через 50 ч культивирования, максимальное накопление проинсулина наблюдалось через 72 ч культивирования. В выбранных условиях ферментации максимальное значение продуктивности составляло 139,17 мг/л при значении биомассы 154,5 г/л. Стационарная фаза роста контрольного штамма YS3/pF1445

(*TPI1*) наблюдалось через 72 ч культивирования, при этом максимальное значение продуктивности (23 мг/л) было достигнуто через 50 ч культивирования, после чего данный показатель снижался.

Таким образом, для штамма YS3/pF1201 (*TDH3*) наблюдались более высокие значения продуктивности и накопления биомассы по сравнению с контрольным штаммом YS3/pF1145 (*TPI1*). Это может быть связано с тем, что экспрессия проинсулина штаммом YS3/pF1201 (*TDH3*) в меньшей степени репрессируется глюкозой.

ВЫВОДЫ

1. Получены штаммы *S. cerevisiae*, в которых экспрессия проинсулина находится под контролем промоторов *TPI*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3*.

2. Промоторы по их силе для экспрессии проинсулина можно распределить в ряду *TDH3* > *ALD4* > *ADH2* > *TEF1* > *TPI1*.

3. Максимальные значения показателей накопления биомассы и выхода проинсулина были установлены для штамма *S. cerevisiae* YS3/pF1201, в котором экспрессия проинсулина осуществлялась под контролем промотора *TDH3*.

Спустя 42 ч после начала культивирования концентрация проинсулина в культуральной жидкости достигала $15,51 \pm 0,57$ мг/л при удельной продуктивности $0,43 \pm 0,02$ мг/г.

4. В процессе ферментации в лабораторном биореакторе продуктивность штамма *S. cerevisiae* YS3/pF1201 (*TDH3*) достигала 139,17 мг/л через 72 ч после начала культивирования при значении биомассы 154,5 г/л. Данный показатель в 6,1 раза превышал продуктивность штамма с классическим промотором *TPI1*, который используется для получения инсулинов.

5. Ограничением проведенного исследования является то, что сравнительная оценка активности промоторов была выполнена лишь для пяти конститутивных последовательностей в стандартных лабораторных условиях и в рамках одной экспрессионной конструкции без модификации других регуляторных элементов. Для подтверждения промышленной применимости полученных результатов требуется исследовать влияние параметров культивирования на продуктивность штамма-продуцента и стабильность экспрессии, а также осуществить масштабирование процесса культивирования.

Литература/References

1. Navarrete C, Jacobsen IH, Martínez JL, Procentese A. Cell factories for industrial production processes: Current issues and emerging solutions. *Processes*. 2020;8(7):768. <https://doi.org/10.3390/pr8070768>
2. Slathia PS, Sagrika Sharma E, Khan IA, et al. Recombinant production of therapeutic proteins. In: Singh DB, Tripathi T, eds. *Protein-based therapeutics*. Springer, Singapore; 2023. P. 101–29. https://doi.org/10.1007/978-981-19-8249-1_4
3. Gomes AR, Byregowda SM, Veeregowda BM, Balamurugan V. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Adv Anim Vet Sci*. 2016;4(7):346–56. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>
4. Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*. 2012;30(5):1108–18. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>
5. Huang M, Wang G, Qin J, et al. Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(47):E11025–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809921115>
6. Madhavan A, Arun KB, Sindhu R, et al. Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microb Cell Fact*. 2021;20(1):124. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>
7. Zhao M, Ma J, Zhang L, Qi H. Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2024;23:32. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02299-z>
8. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast. *Bioengineered*. 2013;4(4):207–11. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>
9. Zepeda AB, Pessoa Jr A, Farias JG. Carbon metabolism influenced for promoters and temperature used in the heterologous protein production using *Pichia pastoris* yeast. *Braz J Microbiol*. 2018;49 Suppl 1:119–27. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.03.010>
10. Schenk J, Balazs K, Jungo C, et al. Influence of specific growth rate on specific productivity and glycosylation of a recombinant avidin produced by a *Pichia pastoris* Mut+ strain. *Biotechnol Bioeng*. 2008;99(2):368–77. <https://doi.org/10.1002/bit.21565>
11. Maury J, Kannan S, Jensen NB, et al. Glucose-dependent promoters for dynamic regulation of metabolic pathways. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:63. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00063>
12. Li S, Ma L, Fu W, et al. Programmable synthetic upstream activating sequence library for fine-tuning gene expression levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*. 2022;11(3):1228–39. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00511>
13. Deng J, Wu Y, Zheng Z, et al. A synthetic promoter system for well-controlled protein expression with different carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2021;20:202. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01691-3>
14. Liu R, Liu L, Li X, et al. Engineering yeast artificial core promoter with designated base motifs. *Microb Cell Fact*. 2020;19(1):38. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01305-4>
15. Tang H, Wu Y, Deng J, et al. Promoter architecture and promoter engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites*. 2020;10(8):320. <https://doi.org/10.3390/metabo10080320>
16. He S, Zhang Z, Lu W. Natural promoters and promoter engineering strategies for metabolic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2023;50(1):kuac029 <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac029>
17. Otto DS, Rudolf F. Constitutive and regulated promoters in yeast: how to design and make use of promoters in *S. cere-*

- visiae*. In: Smolke C, Lee SY, Nielsen J, Stephanopoulos G, eds. *Synthetic biology. Parts, devices and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2018. P. 107–30.
<https://doi.org/10.1002/9783527688104.ch6>
18. Myburgh MW, Schwerdtfeger KS, Cripwell RA, et al. Promoters and introns as key drivers for enhanced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Gadd GM, Sariaslani S, eds. *Advances in applied microbiology*. Academic Press; 2023. P. 1–29.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2023.07.002>
19. Feng X, Marchisio MA. *Saccharomyces cerevisiae* promoter engineering before and during the synthetic biology era. *Biology (Basel)*. 2021;10(6):504.
<https://doi.org/10.3390/biology10060504>
20. Peng B, Williams TC, Henry M, et al. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities. *Microb Cell Fact*. 2015;14:91.
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0278-5>
21. Partow S, Siewers V, Bjørn S, et al. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2010;27(11):955–64.
<https://doi.org/10.1002/yea.1806>
22. Sun J, Shao Z, Zhao H, et al. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(8):2082–92.
<https://doi.org/10.1002/bit.24481>
23. Scott EW, Allison HE, Baker HV. Characterization of *TPI* gene expression in isogenic wild-type and *gcr1*-deletion mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(23):7099–107.
<https://doi.org/10.1093/nar/18.23.7099>
24. Compagno C, Brambilla L, Capitanio D, et al. Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Yeast*. 2001;18(7):663–70.
<https://doi.org/10.1002/yea.715>
25. Vignais ML, Huet J, Buhler JM, Sentenac A. Contacts between the factor TUF and RPG sequences. *J Biol Chem*. 1990;265(24):14669–74.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)77354-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)77354-7)
26. Munshi R, Kandl K, Carr-Schmid A, et al. Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast. *Genetics*. 2001;157(4):1425–36.
<https://doi.org/10.1093/genetics/157.4.1425>
27. Bi X, Broach JR. *UASrpg* can function as a heterochromatin boundary element in yeast. *Genes Dev*. 1999;13(9):1089–101.
<https://doi.org/10.1101/gad.13.9.1089>
28. Price VL, Taylor WE, Clevenger W, et al. Expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* using the *ADH2* promoter. *Methods Enzymol*. 1990;185:308–18.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85027-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85027-1)
29. Saint-Prix F, Bönquist L, Dequin S. Functional analysis of the *ALD* gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology (Reading)*. 2004;150(Pt 7):2209–20.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.26999-0>
30. Navarro-Aviño JP, Prasad R, Miralles VJ, et al. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes. *Yeast*. 1999;15(10A):829–42.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199907\)15:10a<829::Aid-yea423>3.0.Co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199907)15:10a<829::Aid-yea423>3.0.Co;2-9)
31. Kjeldsen T, Balschmidt P, Diers I, et al. Expression of insulin in yeast: the importance of molecular adaptation for secretion and conversion. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2001;18:89–121.
<https://doi.org/10.1080/02648725.2001.10648010>
32. Redden H, Alper HS. The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters. *Nat Commun*. 2015;6:7810.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8810>
33. Yagi S, Yagi K, Fukuoka J, Suzuki M. The UAS of the yeast *GAPDH* promoter consists of multiple general functional elements including RAP1 and GRF2 binding sites. *J Vet Med Sci*. 1994;56(2):235–44.
<https://doi.org/10.1292/jvms.56.235>
34. Hitzeman RA, Chen CY, Dowbenko DJ, et al. Use of heterologous and homologous signal sequences for secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol*. 1990;185:421–40.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85037-o](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85037-o)
35. Kaishima M, Ishii J, Matsuno T, et al. Expression of varied GFPs in *Saccharomyces cerevisiae*: codon optimization yields stronger than expected expression and fluorescence intensity. *Sci Rep*. 2016;6:35932.
<https://doi.org/10.1038/srep35932>
36. Liu Z, Tyo KE, Martínez JL, et al. Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(5):1259–68.
<https://doi.org/10.1002/bit.24409>
37. Myburgh MW, Rose SH, Viljoen-Bloom M. Evaluating and engineering *Saccharomyces cerevisiae* promoters for increased amylase expression and bioethanol production from raw starch. *FEMS Yeast Res*. 2020;20(6):foaa047.
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa047>
38. Reider Apel A, d'Espaux L, Wehrs M, et al. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(1):496–508.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1023>
39. Zhang J, Cai Y, Du G, et al. Evaluation and application of constitutive promoters for cutinase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol*. 2017;55:538–44.
<https://doi.org/10.1007/s12275-017-6514-4>
40. Kjeldsen T, Andersen AS, Hubálek F, et al. Molecular engineering of insulin for recombinant expression in yeast. *Trends Biotechnol*. 2024;42(4):464–78.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.09.012>
41. Хасаншина ЗР, Лунев ИС, Филипенко АА и др. Оптимизация условий культивирования штамма *Saccharomyces cerevisiae* – продуцента проинсулина. *Биотехнология*. 2022;38(3):35–48. Khasanshina ZR, Lunev IS, Filipenko AA, et al. Optimization of cultivation condition for the *Saccharomyces cerevisiae* strain producing proinsulin. *Russian Journal of Biotechnology*. 2022;38(3):35–48 (In Russ.).
<https://doi.org/10.56304/S0234275822030036>
42. Kjeldsen T. Yeast secretory expression of insulin precursors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000;54(3):277–86.
<https://doi.org/10.1007/s002530000402>
43. Kazemi Seresht A, Nørgaard P, Palmqvist EA, et al. Modulating heterologous protein production in yeast: the applicability of truncated auxotrophic markers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(9):3939–48.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4263-1>
44. Andersen AS, Diers I. Production of heterologous polypeptides in yeast. 2005. US patent US6861237B2.
<https://patents.google.com/patent/US6861237B2/en>
45. Grey M, Brendel M. A ten-minute protocol for transforming *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Curr Genet*. 1992;22(4):335–6.
<https://doi.org/10.1007/bf00317931>
46. Corbacho I, Teixidó F, Velázquez R, et al. Standard YPD, even supplemented with extra nutrients, does not always compensate growth defects of *Saccharomyces*

cerevisiae auxotrophic strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011;99(3):591–600.
<https://doi.org/10.1007/s10482-010-9530-5>
47. Marty MT, Baldwin AJ, Marklund EG, et al. Bayesian de-

convolution of mass and ion mobility spectra: from binary interactions to polydisperse ensembles. *Anal Chem*. 2015;87(8):4370–6.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00140>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.А. Буслаева** — идея, планирование и проведение экспериментов, анализ данных, написание текста рукописи; **З.Р. Хасаншина** — планирование и анализ данных эксперимента, написание текста рукописи; **И.А. Корнаков** — проведение экспериментов по культивированию; **М.П. Коробкина** — проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии; **В.И. Шмурак** — проведение хромато-масс-спектрометрии; **Р.В. Драй** — определение основного направления исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Благодарности. Исследование проводилось при спонсорской поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Авторы выражают признательность коллегам, которые оказывали помощь в выполнении исследования, сотрудникам лаборатории генной инженерии и ферментации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.A. Buslaeva** suggested the study idea, planned and carried out experiments; analysed data; and drafted the manuscript. **Z.R. Khasanshina** conceptualised, planned experiments, analysed experimental data, and drafted the manuscript. **I.A. Kornakov** carried out cultivation experiments. **M.P. Korobkina** performed high-performance liquid chromatography. **V.I. Shmurak** performed liquid chromatography-mass spectrometry. **R.V. Drai** set the main research direction and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study was supported by GERO-PHARM. The authors are grateful to their colleagues from the Laboratory for genetic engineering and fermentation who helped them with this study.

Об авторах / Authors

Буслаева Евгения Александровна / *Eugenia A. Buslaeva*

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4389-8605>

Хасаншина Зухра Рамилевна / *Zukhra R. Khasanshina*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>

Корнаков Игорь Александрович / *Igor A. Kornakov*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0207-5244>

Коробкина Мария Павловна / *Mariya P. Korobkina*

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-9807-7783>

Шмурак Владимир Игоревич / *Vladimir I. Shmurak*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0282-9843>

Драй Роман Васильевич, канд. мед. наук / *Roman V. Drai*, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

Поступила 13.05.2025

После доработки 23.07.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 13 May 2025

Revised 23 July 2025

Accepted 12 September 2025