
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.66

КЛОНИРОВАНИЕ КДНК ГЛЮКОАМИЛАЗЫ *ASPERGILLUS AWAMORI* В ДРОЖЖЕВОЙ ИНТЕГРАТИВНЫЙ ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР

Е. В. КУЛИК¹⁾, О. Б. РУСЬ¹⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

На основе дрожжевого вектора рKLAC2 сконструирована плазмида рKGLA-1 с кДНК глюкоамилазы гриба *Aspergillus awamori* 466. В результате проведенного клонирования нуклеотидной последовательности гена *glaA* в клетках *Kluyveromyces lactis* GG799 синтезируется рекомбинантный фермент с нативным N-концом. С помощью реакции амплификации целевого гена и рестрикционного анализа генетической конструкции подтверждено успешное создание плазмиды рKGLA-1. Эффективность экспрессии целевого гена в дрожжевых клетках, обусловленной интеграцией экспрессионной кассеты в область промотора LAC4 геномной ДНК вследствие гомологичной рекомбинации, доказана чашечным методом. Рекомбинантные клетки *K. lactis* росли на селективной минимальной среде с добавлением 5 ммоль/л ацетамида и секретируют глюкоамилазу, о чем свидетельствовали зоны гидролиза крахмала вокруг колоний. Практическое применение сконструированной плазмиды может быть реализовано при создании различных дрожжевых штаммов-продуцентов глюкоамилаз гриба *A. awamori* с определенными промышленно значимыми свойствами.

Ключевые слова: клонирование; глюкоамилаза; интегративный экспрессионный вектор; *Kluyveromyces lactis*.

Образец цитирования:

Кулик ЕВ, Русь ОБ, Евтушенко АН. Клонирование кДНК глюкоамилазы *Aspergillus awamori* в дрожжевой интегративный экспрессионный вектор. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;3:59–66. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-59-66>

For citation:

Kulik AV, Rus OB, Evtushenkov AN. Cloning of cDNA glucoamylase *Aspergillus awamori* into yeast integrative expression vector. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2019; 3:59–66. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-59-66>

Авторы:

Елена Вячеславовна Кулик – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Ольга Борисовна Русь – кандидат химических наук, доцент; доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Анатолий Николаевич Евтушенко – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Alena V. Kulik, PhD (biology); head of the laboratory of transgenic plants at the department of molecular biology, faculty of biology.

alena.kulik31@gmail.com

Olga B. Rus, PhD (chemistry), docent; associate professor at the department of molecular biology, faculty of biology.

zrbio@mail.ru

Anatoliy N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; head of the department of molecular biology, faculty of biology.

evtushenkov@bsu.by

CLONING OF cDNA GLUCOAMYLASE *ASPERGILLUS AWAMORI* INTO YEAST INTEGRATIVE EXPRESSION VECTOR

A. V. KULIK^a, O. B. RUS^a, A. N. EVTUSHENKOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. V. Kulik (alena.kulik31@gmail.com)

We constructed pKLAC2-based integrative expression plasmid pKGLA-1 with *glaA* gene from *Aspergillus awamori* 466. The PCR amplification of the target gene *glaA* and restriction analysis proved pKGLA-1 construction. Linearised plasmid was used for the integrative transformation of chemically competent *Kluyveromyces lactis* GG799 cells. Colonies of cells transformed with pKGLA-1 plasmid were selected by growth on agar plates containing 5 mmol/L acetamide. Expression of the heterologous gene in *K. lactis* cells was visually assessed using medium containing 2 % starch. *K. lactis* cells containing integrated pKGLA-1 DNA secreted recombinant protein glucoamylase with a native N-terminus.

Keywords: cloning; glucoamylase; integrative expression vector; *Kluyveromyces lactis*.

Введение

На протяжении длительного времени дрожжи *Kluyveromyces lactis* используются при производстве коммерческих препаратов белков в промышленном масштабе [1; 2]. Этот вид дрожжей внесен Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США (FDA) в список «организмов, признанных безопасными» (generally regarded as safe, GRAS). Биотехнологический процесс получения белков с помощью клеток *K. lactis* детально разработан, а особый статус GRAS подтверждает, что синтезированные препараты могут использоваться в качестве пищевых добавок [3].

Дрожжи *K. lactis* обладают рядом свойств, привлекательных для биотехнологии, в частности, они характеризуются быстрым ростом. Их способность секретировать рекомбинантные белки за пределы клетки позволяет получать стабильный белковый продукт с посттрансляционными модификациями, что значительно повышает рентабельность его производства благодаря снижению затрат на очистку. Возможность простого проведения с дрожжевыми клетками генетических манипуляций обуславливает использование этого эукариотического организма для экспрессии модифицированных генов, детерминирующих синтез белков с определенными характеристиками.

В целях получения дрожжевых штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, накапливающихся за пределами клетки, используется интегративный вектор pKLAC2 [4]. Его конструкция позволяет клонировать целевой ген в область полилинкера, расположенную после нуклеотидной последовательности лидерного пептида α -фактора спаривания (α -MF) *K. lactis*. В этом случае под контролем сильного дрожжевого промотора P_{LAC4} происходит экспрессия гена в виде химерной молекулы с доменом α -фактора. Поскольку рекомбинантные белки, кодируемые генами, клонированными в вектор, подвергаются процессингу Кех-протеазой в аппарате Гольджи, существуют две стратегии для образования химерных белковых молекул с доменом фактора спаривания. В результате реализации первого подхода синтезируется рекомбинантный белок с нативным N-концом, а второго – белок, содержащий на N-конце дополнительные аминокислотные остатки, кодируемые определенным участком вектора. В клонировании по первой модели используется уникальный сайт *XhoI*, который расположен перед областью, детерминирующей аминокислотную последовательность, распознаваемую Кех-протеазой. Ген, клонированный с помощью *XhoI* рестриктазы, должен содержать нуклеотидную последовательность, которая восстанавливает сайт Кех-протеазы для обеспечения процессинга предшественника протеина. В случае когда целевой ген содержит сайт *XhoI* или когда нативный N-конец рекомбинантного белка может быть удален, образование химерного белкового продукта с фактором спаривания достигается путем клонирования целевого гена в любой сайт полилинкера. Рекомбинантный белок, синтезированный таким способом, будет содержать дополнительные аминокислотные остатки, кодируемые нуклеотидной последовательностью векторной ДНК, расположенной между Кех-сайтом и полилинкером.

Для осуществления процесса интеграции экспрессионной кассеты с клонированным геном в локус LAC4 генома *K. lactis* в результате гомологичной рекомбинации необходимо линейаризировать рекомбинантный вектор с помощью рестриктазы *SacII* или *BstXI*. Селективный отбор дрожжевых трансформантов на минимальной среде с ацетамидом обеспечивает ген *amdS*, кодирующий ацетамидазу *A. nidulans* и расположенный в интегрируемой экспрессионной кассете вектора под контролем дрожжевого промотора P_{ADHI}.

Цель работы – создание генетической конструкции с кДНК глюкоамилазы мицелиального гриба *Aspergillus awamori* на основе интегративного дрожжевого вектора рKLAC2. Препараты глюкоамилазы (α -1,4-глюкан-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.3) широко используются для ферментативной обработки крахмалсодержащего сырья в различных отраслях пищевой промышленности, таких как спиртовая, пивоваренная, крахмало-паточная и хлебопекарная. Созданная рекомбинантная конструкция может найти применение для получения различных дрожжевых штаммов-продуцентов глюкоамилаз с определенными свойствами.

Материалы и методы исследования

Эндонуклеазные реакции выполнялись в объеме 20 мкл для рестрикции 1–2 мкг ДНК в соответствующем рестрикционном буфере (*Fermentas*, США). Рестрикционный фермент добавлялся в концентрации 1 единица на 1 мкг ДНК. Реакционные смеси доводились до конечного объема дистиллированной водой и инкубировались при температуре, рекомендуемой для конкретного фермента, в течение 3 ч.

Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции проводили в 0,8 % агарозном геле в ТАЕ-буфере с добавлением бромистого этидия в камере для горизонтального электрофореза (*BioRad*, США), их визуализацию осуществляли с помощью трансиллюминатора.

Выделение из агарозного геля кДНК глюкоамилазы, полученной после рестрикции плазмиды рBGLA-1, осуществляли с использованием коммерческого набора Silica Bead DNA Gel extraction Kit (*Fermentas*).

Для проведения процедуры электротрансформации клеток бактерий готовили электрокомпетентные клетки. Ночную культуру бактерий разводили в соотношении 1 : 25 свежим LB-бульоном и выращивали в условиях аэрации (180 об/мин) при 37 °С до достижения оптической плотности ОП₆₀₀ значения 0,4–0,6. Культуру переносили в центрифужные пробирки и охлаждали на ледяной бане в течение 15 мин. Клетки осаждали центрифугированием (3 мин, 6000 об/мин, 4 °С). Осадок бактерий ресуспендировали в половине исходного объема дистиллированной воды, охлажденной до 4 °С, клетки собирали центрифугированием (3 мин, 6000 об/мин, 4 °С). Процедуру отмывания клеток повторяли дважды, в каждом последующем случае вдвое уменьшая объем воды. Клетки ресуспендировали в примерно равном объему осадка количестве охлажденного 15 % раствора глицерина в воде, замораживали при –70 °С и использовали по необходимости. Электропорацию проводили на приборе MicroPulser (*BioRad*). Применяли электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 1 или 2 мм. К суспензии компетентных клеток в объеме 20 мкл (при использовании 1-миллиметровой кюветы) или 40 мкл (при использовании 2-миллиметровой кюветы) добавляли раствор ДНК, перемешивали. Смесь вносили в предварительно охлажденную кювету, которую помещали в электропоратор, и подавали импульс тока с соответствующим кювете напряжением. После кювету извлекали и добавляли к клеткам 1 мл LB-бульона, содержащего 0,2 % глюкозы. Клетки инкубировали в течение часа при соответствующей температуре, затем высевали на селективные среды.

Трансформацию клеток *K. lactis* проводили согласно протоколу, представленному в [5]. Отбор трансформантов осуществляли в чашках Петри на минимальной среде с добавлением 5 ммоль/л ацетамида.

Чашечный тест на глюкоамилазную активность рекомбинантных клеток дрожжей *K. lactis* проводили в чашках Петри с агаризованной средой Чапека и 2 % крахмалом.

Смесь для амплификации одного образца объемом 15 мкл имела следующий состав: 100–200 нг ДНК, 1,5 мкл 10х-буфера, 0,3 мкл 10 ммоль/л смеси нуклеотидов (*Fermentas*), 0,5 мкмоль/л каждого из праймеров (glaAF cccctcgagaaaagagcgaccttggttcgtggtgag, glaAR cccgaattcctaccgccaggtgtcagtcacc), 0,25 единиц Taq ДНК-полимеразы (*Fermentas*), дистиллированная вода до конечного объема 15 мкл. ПЦР проводили в амплификаторе (*BioRad*) с использованием следующих профилей: предварительная денатурация – 94 °С, 5 мин; денатурация – 94 °С, 30 с, отжиг праймеров – 61 °С, 30 с, элонгация – 72 °С, 2 мин, 35 циклов; ренатурация – 72 °С, 10 мин; 4 °С, до изъятия проб.

Результаты и их обсуждение

В мировом биотехнологическом производстве белковых коммерческих препаратов широко используются дрожжи *K. lactis* благодаря их способности в процессе культивирования на простых по химическому составу средах быстро достигать высокой плотности и эффективно секретируют большие количества гетерологичного белка [6–13]. Для создания штаммов *K. lactis*, синтезирующих определенные белки, необходимо конструирование интегративной плазмиды с клонированным целевым геном и ее введение в дрожжевые клетки. Высокий уровень экспрессии гетерологичных генов в дрожжах, как одна из важных характеристик штаммов, может обеспечиваться различными промоторами

собственных генов *K. lactis* или промоторами из дрожжей других видов [1; 2; 13–17]. Однако наиболее часто используемым является сильный *LAC4*-промотор *K. lactis*, который регулирует экспрессию β -галактозидазы, необходимую для утилизации клеткой лактозы [18]. Этот промотор содержится в составе коммерческого интегративного вектора pKLAC2, применяемого для обеспечения секреции гетерологичных белков клетками *K. lactis* [4]. Встраивание экспрессионной кассеты pKLAC2 с целевым геном в область *LAC4*-промотора дрожжевой хромосомной ДНК обеспечивает генетическую стабильность промышленных штаммов в течение их длительного культивирования в биореакторе [1].

Один из важных аспектов конструирования штаммов с биотехнологическим потенциалом – возможность эффективной экспрессии функционально активных целевых белков в клетках неродственного организма. Это обусловлено явлением неравных частот встречаемости синонимичных кодонов в кодирующих областях генома у различных организмов [19–22]. Популяционно-генетические исследования показали, что синонимичные сайты находятся под слабым селекционным отбором и кодонное предпочтение поддерживается благодаря балансу между процессом естественного отбора, мутациями и дрейфом генов [19].

С использованием компьютерной программы [23] нами был определен индекс адаптации кодонов (codon adaptation index, CAI) гена *glaA* *A. awamori*, экспрессирующегося в клетках *K. lactis*. Его значение составило 0,662, что указывает на весьма вероятную эффективную экспрессию грибной глюкоамилазы в дрожжевых клетках.

Субклонирование кДНК глюкоамилазы *A. awamori* 466 в интегративный вектор pKLAC2 проводилось из плазмидной ДНК pBGLA-1, созданной на основе вектора pBluescript II SK(-), в который по тупым концам была встроена предварительно амплифицированная кДНК (рис. 1).

Особым образом сконструированные праймеры позволили получить в результате ПЦР продукт целевого гена *glaA*, который на 5'-конце содержал нуклеотидную последовательность для рестрицирующей эндонуклеазы *XhoI* и рядом расположенный участок, детерминирующий восстановление области, распознаваемой Kex-протеазой. На 3'-конце ампликона синтезировался сайт для рестриктазы *EcoRI*. В результате обработки плазмиды pBGLA-1 ферментами *EcoRI* и *XhoI* образовавшиеся продукты гидролиза разделяли в агарозном геле и выделяли необходимую для клонирования кДНК. Вектор pKLAC2 был также подвержен рестрикции этими же ферментами.

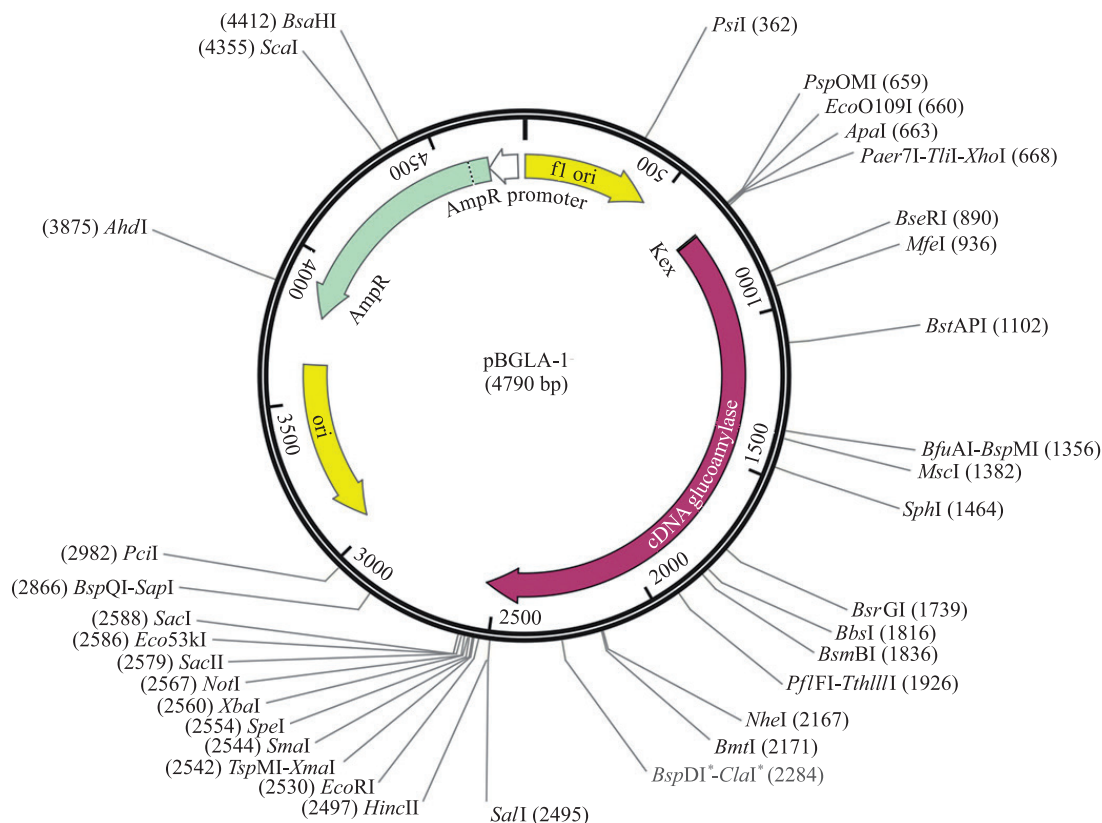


Рис. 1. Генетическая карта плазмиды pBGLA-1

Fig. 1. Genetic map of the pBGLA-1 plasmid

После проведения реакции лигирования рестрицированных дрожжевого вектора и кДНК в компетентные клетки *E. coli* XL-10 Gold вводилась созданная генетическая конструкция с использованием электропорации. Применение методически простой системы клонирования в клетках *E. coli* обусловлено наличием в рKLAC2 репликона рМВ1 *E. coli*.

Отбор рекомбинантов осуществлялся с помощью диагностической ПЦР с праймерами к целевому гену. На рис. 2 представлена электрофореграмма продуктов амплификации, полученных при использовании колоний трансформантов.

Из клеток колоний, в результате ПЦР с которыми был получен ампликон, выделялись плазмидные ДНК. Для определения наличия кДНК глюкоамилазы в составе созданной конструкции рKGLA-1 проводился рестрикционный анализ с помощью рестрицирующей эндонуклеазы *EcoRI*. Анализ продуктов рестрикции подтвердил присутствие вставки кДНК в сконструированной плазмиде (рис. 3). В частности, обработка ферментом всех анализируемых образцов плазмид рKGLA-1 приводила к образованию продукта, размер которого превышал таковой исходного вектора без вставки.

Другим методическим подходом, подтверждающим наличие вставки кДНК глюкоамилазы в составе сконструированной плазмиды рKGLA-1, являлась реакция амплификации с праймерами к гену *glaA*. В качестве матрицы использовали выделенную из рекомбинантов генетическую конструкцию. Результаты проведенной ПЦР показывают (рис. 4), что сконструированная плазмида рKGLA-1 содержит вставку – кДНК глюкоамилазы *A. awamori*.

Таким образом, на основе интегративного вектора для дрожжей создана генетическая конструкция, содержащая кДНК глюкоамилазы *A. awamori* (рис. 5).

В целях оценки эффективности функционирования созданной интегративной плазмиды в дрожжевых клетках была проведена трансформация компетентных клеток *K. lactis* GG799. Отбор рекомбинантов осуществлялся с использованием ацетидазного селективного маркера (*amdS*), экспрессия которого находится под дрожжевым промотором *ADHI*. В трансформированных дрожжевых клетках

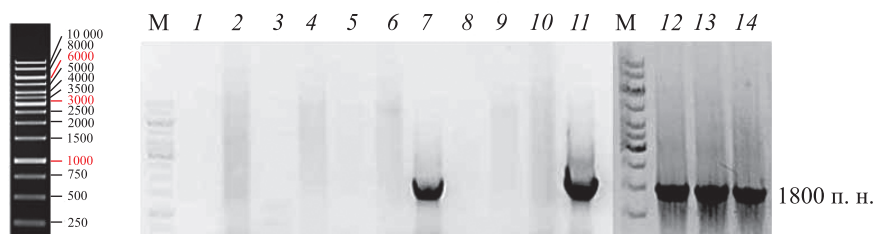


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов, полученных с использованием колоний трансформантов *E. coli* XL-10 Gold. Матрицей являлись: 1 – вектор рKLAC2 (отрицательный контроль); 2–10, 12–14 – колонии трансформантов; 11 – плазмида рBGLA-1 (положительный контроль). М – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 2. Agarose electrophoresis of PCR amplicons obtained by PCR from *E. coli* XL-10 Gold transformants. 1 – plasmid pKLAC2 (negative control); 2–10, 12–14 – colonies; 11 – plasmid pBGLA-1 (positive control); M – marker DNA, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

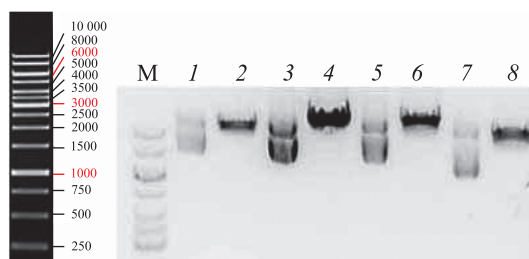


Рис. 3. Электрофореграмма рестрикционных фрагментов ДНК рKGLA-1 и рKLAC2: 1, 3, 5 – исходная плазмида рKGLA-1; 2, 4, 6 – продукт рестрикции плазмиды рKGLA-1; 7 – исходный вектор рKLAC2; 8 – продукт рестрикции вектора рKLAC2; М – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 3. Agarose gel illustrating the *EcoRI* digestion of the pKGLA-1 and pKLAC2 plasmids: 1, 3, 5 – pKGLA-1 without digestion; 2, 4, 6 – *EcoRI* digestion of pKGLA-1; 7 – pKLAC2 without digestion; 8 – *EcoRI* digestion of pKLAC2; M – marker DNA, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

в отличие от исходных должна происходить экспрессия ацетамидазы, что позволяет им утилизировать ацетамид в качестве единственного источника азота и расти на минимальной среде с этим химическим соединением. Для проверки глюкоамилазной активности чашечным методом дрожжевые колонии, отобранные на минимальной среде с добавлением 5 ммоль/л ацетамида, пересеивались на питательную среду с субстратом для глюкоамилазы – крахмалом. Как показано на рис. 6, зоны гидролиза крахмала наблюдались у 24 из 32 клонов.

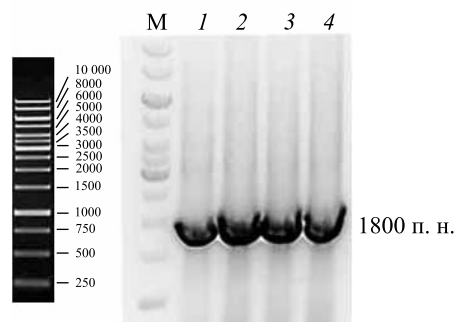


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *glaA* *A. awamori* и плазмидной ДНК pKGLA-1 рекомбинантов (1–4).

М – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 4. Agarose electrophoresis of PCR amplicons obtained by PCR with plasmid DNA pKGLA-1 (1–4) and gene-specific primers for *glaA* from *A. awamori*.

М – marker DNA, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

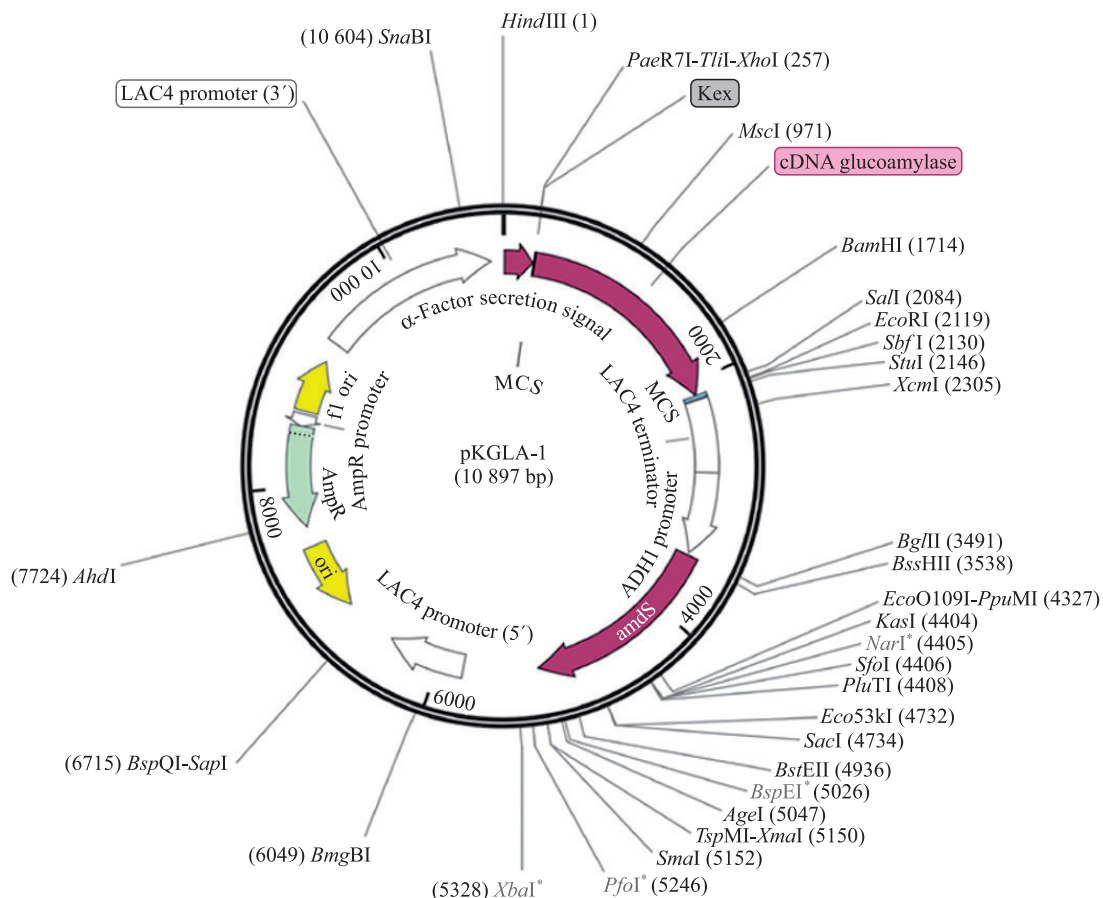


Рис. 5. Генетическая карта плазмиды pKGLA-1

Fig. 5. Genetic map of the pKGLA-1 plasmid

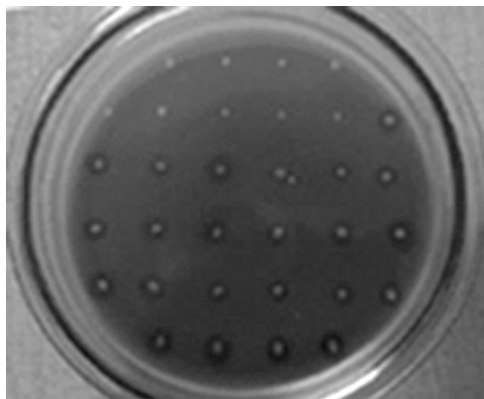


Рис. 6. Чашечный тест на глюкоамилазную активность рекомбинантных клеток дрожжей *K. lactis* с плазмидой pKGLA-1, выросших на агаризованной среде с добавлением крахмала

Fig. 6. Analysis of the glucoamylase expression in *K. lactis* cells with the pKGLA-1 plasmid. The cells were grown on the starch agar

Наличие зон гидролиза крахмала вокруг 24 колоний свидетельствует о секреции рекомбинантными клетками дрожжей глюкоамилазы грибов *A. awamori*, что подтверждает интеграцию экспрессионной кассеты в область промотора LAC4 геномной ДНК вследствие гомологичной рекомбинации и функциональную активность созданной конструкции pKGLA-1 в *K. lactis*.

Заключение

Создана генетическая конструкция pKGLA-1 с кДНК глюкоамилазы гриба *A. awamori* 466 на основе интегративного вектора для дрожжей pKLAC2. В результате клонирования нуклеотидной последовательности гена *glaA* в клетках *K. lactis* GG799 синтезируется рекомбинантный фермент с нативным N-концом. Подтверждением успешного создания конструкции pKGLA-1 служат амплификация целевого гена и рестрикционный анализ ДНК плазмиды.

Эффективность экспрессии целевого гена в дрожжевых клетках, обусловленной интеграцией экспрессионной кассеты в область промотора LAC4 геномной ДНК вследствие гомологичной рекомбинации, доказана чашечным методом. Рекомбинантные клетки *K. lactis* росли на селективной минимальной среде с добавлением 5 ммоль/л ацетамида и секретиовали глюкоамилазу, о чем свидетельствовали зоны гидролиза крахмала вокруг колоний.

Практическое применение сконструированной плазмиды может быть реализовано при создании различных дрожжевых штаммов-продуцентов глюкоамилаз гриба *A. awamori* с определенными промышленно значимыми свойствами.

Библиографические ссылки / References

1. Swinkels BW, van Ooyen AJ, Bonekamp FJ. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993;64(2):187–201. DOI: 10.1007/bf00873027.
2. van den Berg JA, van der Laken KJ, van Ooyen AJ, Renniers TC, Rietveld K, Schaap A, et al. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology (N Y)*. 1990;8(2):135–139. DOI: 10.1038/nbt0290-135.
3. Breunig KD, de Steensma HY. *Kluyveromyces lactis*: genetics, physiology, and application. In: de Winde JH, editor. *Functional genetics of industrial yeast. Topics in Current Genetics. Volume 2*. Berlin: Springer; 2003. DOI: 10.1007/3-540-37003-X_6.
4. Read JD, Colussi PA, Ganatra MB, Taron CH. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(16):5088–5096. DOI: 10.1128/AEM.02253-06.
5. Yeast Protocols Handbook [Internet]. S. a.: Clontech; 2009 [cited 2019 March 10]. Available from: <http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/PT3024-1.pdf>.
6. De Silva C, Dhanapala P, King S, Doran T, Tang M, Suphioglu C. Immunological Comparison of Native and Recombinant Hen's Egg Yolk Allergen, Chicken Serum Albumin (Gal d 5), Produced in *Kluyveromyces lactis*. *Nutrients*. 2018;10(6):E757. DOI: 10.3390/nut10060757.
7. Stressler T, Leisibach D, Lutz-Wahl S, Kuhn A, Fischer L. Homologous expression and biochemical characterization of the arylsulfatase from *Kluyveromyces lactis* and its relevance in milk processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(12):5401–5414. DOI: 10.1007/s00253-016-7366-2.
8. Jiménez JJ, Borrero J, Diep DB, Gútiez L, Nes IF, Herranz C, et al. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2013;40(9):977–993. DOI: 10.1007/s10295-013-1302-6.

9. Jo HJ, Noh JS, Kong KH. Efficient secretory expression of the sweet-tasting protein brazzein in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expression Purification*. 2013;90(2):84–89. DOI: 10.1016/j.pep.2013.05.001.
10. Rodicio R, Heinisch JJ. Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 2013;30(5):165–177. DOI: 10.1002/yea.2954.
11. Bui DM, Kunze I, Horstmann C, Schmidt T, Breunig KD, Kunze G. Expression of the *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996;45(1–2):102–106. DOI: 10.1007/s002530050655.
12. Fleer R, Chen XJ, Amellal N, Yeh P, Fournier A, Guinet F, et al. High-level secretion of correctly processed recombinant interleukin-1 β in *Kluyveromyces lactis*. *Gene*. 1991;107(2):285–295. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90329-a.
13. Saliola M, Mazzoni C, Solimando N, Crisa A, Falcone C, Jung G, Fleer R. Use of the KlADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;65(1):53–60. PMID: PMC90982.
14. Fleer R, Yeh P, Amellal N, Maury I, Fournier A, Bacchetta F, et al. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology (N Y)*. 1991;9(10):968–975. DOI: 10.1038/nbt1091-968.
15. Rossoloini GM, Riccio ML, Gallo E, Galeotti CL. *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination. *Gene*. 1992;119(1):75–81. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90068-z.
16. Tanaka R, Ishibashi M, Tokunaga H, Tokunaga M. Secretion of hen egg white lysozyme from *Kluyveromyces lactis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2000;64(12):2716–2718. DOI: 10.1271/bbb.64.2716.
17. Walsh DJ, Bergquist PL. Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in *Kluyveromyces lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(8):3297–3300.
18. Colussi PA, Taron CH. *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(11):7092–7098. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7092-7098.2005.
19. Hershberg R, Petrov DA. Selection on codon bias. *Annual Review of Genetics*. 2008;42:287–299. DOI: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091442.
20. Lloyd AT, Sharp PM. Synonymous codon usage in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 1993;9(11):1219–1228. DOI: 10.1002/yea.320091109.
21. Freire-Picos MA, González-Siso MI, Rodríguez-Belmonte E, Rodríguez-Torres AM, Ramil E, Cerdán ME. Codon usage in *Kluyveromyces lactis* and in yeast cytochrome *c*-encoding genes. *Gene*. 1994;139(1):43–49. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90521-5.
22. Cripwell RA, Rose SH, van Zyl WH. Expression and comparison of codon optimized *Aspergillus tubingensis* amylase variants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2017;17(4):1–12. DOI: 10.1093/femsyr/fox040.
23. Puigbo P, Bravo IG, García-Vallve S. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*. [Internet] 2008 [cited 2019 August 24];3:38. Available from: <http://genomes.urv.es/CAIcal>.

Статья поступила в редколлегию 04.09.2019.
Received by editorial board 04.09.2019.