

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНА *YScx1* ДРОЖЖЕЙ *Yarrowia lipolytica* –  
В ТРАНСПОРТЕ ИЗОЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КЛЕТКИ  
И ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
КОМБИНИРОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД**

© 2025 г. Д. А. Дементьев<sup>1, 2, \*, \*\*</sup>, Т. А. Хабибуллин<sup>1, 2</sup>,  
А. А. Колобов<sup>1, 2</sup>, А. А. Корнеева<sup>1, 2</sup>, С. П. Синеокий<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Национального  
исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

<sup>2</sup>НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

\*e-mail: dmitry@dementiev-da.ru

\*\*e-mail: nrcki@nrcki.ru

Поступила в редакцию 25.11.2024 г.

После доработки 01.12.2024 г.

Принята к публикации 10.12.2024 г.

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* в настоящее время являются наиболее перспективной платформой для разработки эффективной биотехнологии получения промышленно-ценной изолимонной кислоты (ИЛК), входящей в состав некоторых фруктовых соков и обладающей в отличие от лимонной кислоты (ЛК) рядом ценных свойств. Разработка дрожжевых продуцентов ИЛК основывается на изучении генетического контроля ее синтеза и использовании методологии генетической и метаболической инженерии для направленной генетической модификации различных этапов синтеза и клеточного транспорта ИЛК. Изучена роль гена *YScx1* – транспортера ЛК и ИЛК из клетки. Исследовано влияние использования комбинированных питательных сред на основе глюкозной патоки на эффективность синтеза ИЛК.

**Ключевые слова:** *Yarrowia lipolytica*, *YScx1*, изолимонная кислота (ИЛК), лимонная кислота (ЛК), кукурузное масло

**DOI:** 10.56304/S0234275825010053

Изолимонная кислота (ИЛК,  $C_6H_8O_7$ , молярная масса 192.12 г/моль) – бесцветное кристаллическое вещество, слабо растворимое в воде и органических растворителях. Температура плавления  $\sim 125^\circ C$ , значения констант диссоциации кислоты  $pK_a$  – 3.29, 4.71 и 6.40. В цикле трикарбоновых кислот ИЛК образуется из лимонной кислоты (ЛК) под действием аконитатгидратазы и превращается в  $\alpha$ -кетоглутарат с помощью изоцитратдегидрогеназы, участвуя в метаболизме. В природе ИЛК (стереоизомер трео-Ds-изоцитрат ((2R,3S)-изоцитрат) входит в состав соков различных фруктов, в частности цитрусовых и ягод (например в ягодах ежевики) [1].

ИЛК, обладает рядом ценных потребительских свойств и перспективна для широкого использования в спортивном питании, медицинской и пищевой промышленности [2].

**Список сокращений:** AcCoA – ацетилкофермент А; ЛК – лимонная кислота; ИЛК – изолимонная кислота; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

Возможности широкого использования ИЛК зависят от разработки эффективных биотехнологий, позволяющих снизить ее себестоимость. Наиболее перспективной платформой для разработки промышленных продуцентов ИЛК являются хорошо изученные и высокотехнологичные дрожжи *Yarrowia lipolytica* – природные продуценты как лимонной, так и изолимонной органических кислот [3].

В целях разработки продуцентов ЛК и ИЛК на основе этих дрожжей проведены многочисленные селекционные, микробиологические, физиологические, генетические и гено-инженерные исследования. Существенный прогресс был достигнут в последние годы благодаря выявлению и изучению митохондриальных транспортеров цитрата (ген *YUhm2* [4]) и изоцитрата (ген *YSfc1* [5]), а также демонстрации влияния направленного изменения их активности на уровень накопления ИЛК и конверсии углерода в целевой продукт.

Актуальной задачей является дальнейшее выявление и изучение всех этапов биосинтеза и

транспорта ИЛК, важных для повышения технологических показателей продуцентов, и оптимизация технологий ферментации.

Цель данной работы – исследование влияния гена *YlCex1* на продукцию ИЛК в дрожжах *Y. lipolytica*. Ген *YlCex1* контролирует транспорт цитрата из клетки и предположительно изоцитрата [6]. Штамм продуцент ИЛК *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4657 ( $\Delta YlYhm2 YlAMPD YlSfc1$ ) [5, 7] является хорошей основой для выполнения данной цели. Кроме того планировалось изучить влияние добавления кукурузного масла в культуральную среду на основе глюкозы на уровень накопления ИЛК и конверсию глюкозы в целевой продукт.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы и среды

Для стандартных генно-инженерных работ (конструкция плазмид, наработка плазмидной ДНК) использовали бактерии *E. coli* штамм *XLI-Blue*, а штамм *EcoRed* применяли для рекомбинирования и создания вспомогательных плазмид серии pCasNA [8]. Бактерии выращивали при 37°C на среде LB (г/л): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5, pH 7.0 при необходимости добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Дрожжи *Y. lipolytica* выращивали при 30°C на средах:

а) богатая питательная среда YPD – пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, глюкоза 20 г/л;

б) минимальная среда для отбора трансформантов YNBD – готовая среда YNB (M139, HiMedia, Индия) с добавлением 20 г/л глюкозы. При необходимости в среды добавляли нурсеотрицин в концентрации 250 мкг/мл (Nat). Все агаризованные среды содержали агар в концентрации 20 г/л;

в) минимальная среда для культивирования в малом объеме YNB<sub>N<sub>0</sub>2D<sub>9</sub></sub> – готовая среда (M151, HiMedia) не содержащая аминокислот и азота, к которой добавляли глюкозу 90 г/л и NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 2 г/л.

### Конструирование плазмид и рекомбинантных штаммов

Ферменты для молекулярной биологии были получены от компании Thermo Fisher Scientific (США). Манипуляции с ДНК выполняли в соответствии с методиками, описанными в работе [9]. Интеграцию ДНК в штаммы дрожжей осуществляли методом химической трансформации ацетатом лития [8].

Праймеры, используемые в работе, синтезированы компанией “Евроген” (Россия) и приведены в таблице S1 дополнительных материалов. Нуклеотидные фрагменты-мишени *Y. lipolytica* амплифицировали с использованием КАРА HiFi PCR-поли-

меразы из штамма W29 (ATCC, 20460). Нуклеотидная последовательность клонированных ПЦР-продуктов определена секвенированием по обеим цепям ДНК компанией “Евроген”.

Полимеразную цепную реакцию проводили в ПЦР амплификаторе T100 (BioRad, США) с объемом смеси 50 мкл. Режим амплификации: 94°C, 3 мин – 1 цикл; 94°C, 20 с; 56°C, 30 с; 72°C, 3 мин – 24 цикла; 72°C, 3 мин – 1 цикл.

Методом, описанным ранее [10], на базе штамма ВКПМ Y-4657 ( $\Delta YlYhm2 YlAMPD YlSfc1$ ), в дальнейшем ВКПМ Y-4657 [7] получили ауксотрофный по урацилу штамм ВКПМ Y-4657 ( $\Delta YlYhm2 YlAMPD YlSfc1$ )  $\Delta ura3$ , в дальнейшем Y-4657- $\Delta ura3$ .

Для инактивации гена *YlCex1* была сконструирована кассета *SOE-PCR-YlCex1* как описано в [8]. Фрагменты ДНК, гомологичные участкам хромосом, расположенным в промоторной области (*YlCex1-Up*) и терминаторной области (*YlCex1-Dn*) нокаутированного гена *YlCex1*, амплифицировали с W29 парами праймеров *YlCex1-Up500-F/YlCex1-Up500-R* и *YlCex1-Dn500-F/YlCex1-Dn500-R*, где у праймеров *YlCex1-Up500-R* и *YlCex1-Dn500-F* были дополнительно добавлены основания на 5'-конце, которые образуют область перекрытия при температуре отжига 65°C. После отжига полученную конструкцию амплифицировали по крайним праймерам *YlCex1-Up500-F* и *YlCex1-Dn500-R*.

Для увеличения эффективности инактивации использовали вспомогательную плазмиду pCNR-Cex1a, работающую с помощью системы CRISPR/Cas9, и сконструированную на базе штамма *EcoRed* методом рекомбинирования с праймером Cex1a-20bp-N [8]. Эписомная плаزمиды pCNR-Cex1a содержит ген *Cas9*, который находится под контролем сильного гибридного промотора UAS1B8-TEF(136) (136 – длина базового промотора в п. н.) [11] и содержит оптимизированные для *Y. lipolytica* кодоны и последовательность, кодирующую сигнал ядерной локализации на С-конце белка. Плазмиды pCNR-Cex1a также содержит промотор полимеразы III типа SCR1, слитый с tPHKGly для экспрессии одноцепочечного РНК-гида (sgРНК), структурную часть sgРНК, 20 п. н. ДНК-мишени к гену *YlCex1* и маркер Nat, кодирующий ген устойчивости к нурсеотрицину. Последовательность из 20 нуклеотидов ДНК-мишени была выбрана с помощью программы ЧНОРЧНОР (Интернет-портал ЧНОРЧНОР <https://chor-chor.cbu.uib.no/>). Инактивацию гена *YlCex1* в дрожжах *Y. lipolytica* проверяли по праймерам Barcode2-F и *YlCex1-chr-R*.

Для интеграции в случайный локус хромосом одной копии гена *YlCex1* создана однокопийная плазмиды pTEFin-uno-*YlCex1*, а многокопийная плазмиды pTEFin-multi-*YlCex1* для интеграции нескольких копий гена *YlCex1*. Ген *YlCex1* был амплифицирован, как для однокопийной, так

и для многокопийной плазмиды с геномной ДНК дрожжей *Y. lipolytica* по праймерам pTEFin-YICex1-F и pTEFin-YICex1-R. Амплифицированные фрагменты были клонированы в вектор плазмиды pHP4d-uno (однокопийная) и в плазмиду pTEFin-uga3d4 (содержащие дефектный маркер uga3d4 для отбора трансформантов с многокопийной интеграцией в геном [12, 13]) путем сборки ДНК по методу Гибсона [14], данные плазмиды предварительно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *XmaII* и *BpiI*. Перед интеграцией в дрожжи плазмиды pTEFin-uno-YICex1 и pTEFin-multi-YICex1 предварительно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SspI* и *NheI* для линейаризации фрагментов (*uno-YICex1* и *multi-YICex1*).

#### Культивирование в малом объеме

Культивирование в малом объеме проводили в пробирках объемом 50 мл, содержащих 10 мл среды, в течение 7 сут при 30°C на орбитальном шейкере при 250 об./мин. Инокулят выращивали в 5 мл YPD и переносили в культуральную среду до конечной  $A_{600} = 0.1$ . Предварительно перед измерением оптической плотности клетки дрожжей промывали от богатой среды водой, чтобы этот фактор не мог повлиять на рост в минимальной среде. Значение pH поддерживали на уровне 4–5 путем добавления стерильного 0.6 М раствора калий-фосфатного буфера. Все штаммы культивировали в трех повторностях.

#### Культивирование штаммов в биореакторах

Инокулят готовили следующим образом: 50 мл пробирки с 10 мл среды YPD засеивали биомассой с агаризованной среды, объемом, который можно взять одной микробиологической петлей и инкубировали на протяжении 24 ч при температуре 30°C и 250 об./мин. Затем пересевали инокулят в колбы объемом 750 мл, содержащие 50 мл среды YPD с начальной плотностью  $A_{600} = 0.2$ , и культивировали в течение 20 ч в тех же условиях. Впоследствии этой культурой засеивали биореакторы в раз-мере 10% (об.) от их начального рабочего объема.

Культивирование штаммов-продуцентов проводили в 3 литровых биореакторах КФ-03 (ООО-фирма “Проинтех”, Пушкино, Россия,) с рабочим объемом 0.75 л на среде, содержащей (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1.4;  $\text{NaCl}$  – 0.5;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – 0.8;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.2; биотин – 0.0005; тиамин – 0.01; раствор микроэлементов – 4.6 мл. Раствор микроэлементов имел следующий состав (г/л):  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 6.0;  $\text{KI}$  – 0.088;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 3.0;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.2;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.955;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 42.0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 65.0;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (конц.) – 5.0. Начальная концентрация глюкозы, как источника углерода, составила 4% (вес./об.) или в случае

альтернативного эксперимента для наращивания биомассы использовали кукурузное масло. После исчерпания начальных источников углерода, начиналась непрерывная подача 53.5% (вес.) раствора глюкозы таким образом, чтобы ее концентрация в среде составляла 10–20 г/л. Ферментацию проводили при 29.0°C, концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 50–55% от насыщения среды воздухом путем изменения скорости мешалки, pH 6,0 поддерживали при помощи автоматического добавления 25% (вес.) раствора  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Культивирование длилось 7 сут. Для измерения сухой массы клеток (dcw) собирали 1 мл клеточной суспензии, промывали водой и лиофилизировали в течение 24 ч с использованием FreeZone 6 Plus (Labconco, США).

Органические кислоты анализировали методом ВЭЖХ с помощью хроматографа Dionex UltiMate 3000 с детекторами VWD-3100 и RefractoMax 521 (Dionex Softron GmbH, Германия) и колонки YMC-Pack Pro C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм, 120A) (YMC CO., LTD, Япония). Для этого 1 мл культуральной среды отбирали и осаждали в течение 5 мин при 15000 г и надосадочную жидкость анализировали методом ВЭЖХ в изократическом режиме с использованием 0.1% ортофосфорной кислоты в качестве элюента. Скорость элюции 1.5 мл/мин, температура 30°C, объем вводимого образца 5 мкл. Идентификацию органических кислот осуществляли при длине волны 210 нм с использованием соответствующих стандартов (Sigma, США).

Результаты, представленные в данной работе, были получены на основе не менее трех экспериментов; для каждой точки проводили два-три параллельные измерения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Изучение влияние инактивации и повышения копияности гена YICex1 на продукцию ИЛК, соотношение ИЛК и ЛК и на конверсию глюкозы в ИЛК*

Для проверки влияния инактивации гена *YICex1* на продукцию ИЛК был получен штамм производный *Y-4657-ΔYICex1* с делецией гена *YICex1*, с последующим восстановлением гена и получения штамма *Y-4657-ΔYICex1-uno YICex1*.

Влияние повышения копияности гена *YICex1* на продукцию ИЛК проверяли с использованием штаммов:

– ВКПМ *Y-4657* - без модификаций гена *YICex1*.

– *Y-4657-uno YICex1*, производный штамма *Y-4657-Dura3*, содержащий одну введенную копию гена *YICex1*;

– *Y-4657-multi YICex1*, производный штамма *Y-4657-Dura3*, содержащий несколько копий (больше 3) гена *YICex1*.

**Таблица 1.** Влияние генетических модификаций по изменению активности гена *YlCex1* на биосинтез ИЛК и ЛК у дрожжей *Y. lipolytica***Table 1.** Effect of genetic modifications by altering the activity of the *YlCex1* gene on the biosynthesis of ILK and LC in yeast *Y. lipolytica*

Штамм и модификация	Сухая масса клеток, г/л	Уровень накопления ИЛК, г/л	Уровень накопления ЛК, г/л	Соотношение ИЛК/ЛК	Конверсия ИЛК, %
ВКПМ Y-4657	20.4 ± 1.1	15.5 ± 1.1	1.7 ± 0.2	9.1	16.4 ± 0.9
Y-4657-Δ <i>YlCex1</i>	19.5 ± 0.9	0	0	—	—
Y-4657-Δ <i>YlCex1-uno YlCex1</i>	19.4 ± 0.9	4.8 ± 0.5	0.8 ± 0.1	6.0	2.6 ± 0.4
Y-4657- <i>uno YlCex1</i>	21.0 ± 1.1	21.3 ± 1.5	3.6 ± 0.3	5.9	29.5 ± 1.2
Y-4657- <i>multi YlCex1</i>	13.0 ± 0.6	10.5 ± 0.8	2.6 ± 0.2	4.0	—

Получение всех штаммов описано в разделе Условия эксперимента. Штаммы культивировали в пробирках (малом объеме) при использовании глюкозы в качестве субстрата. Результаты проверки влияния инактивации гена *YlCex1* и его копии на продукцию ИЛК приведены в табл. 1.

Согласно полученным данным инактивация гена *YlCex1* приводит к прекращению накопления как ИЛК, так и ЛК в культуральной среде, что согласуется с известными данными об участии этого транспортера в транспорте из клетки как цитрата, так изоцитрата [6].

Введение копии гена *YlCex1* в штамм Y-4657-Δ*YlCex1* приводит к частичному, но не полному восстановлению накопления ИЛК в КЖ (по сравнению с родительским штаммом ВКПМ Y-4657). Частичное восстановление активности *YlCex1* может быть связано с негомологичной интеграцией в случайный локус хромосомы, или недостаточной силой промотора TEFin, использованного при клонировании гена *YlCex1*.

Введение дополнительной копии гена *YlCex1* в штамм ВКПМ Y-4657 привело к увеличению накопления как ИЛК, так и ЛК в полученном штамме Y-4657-*uno YlCex1*. Причем в процентном соотношении ЛК в большей степени (см. табл. 1). Влияния на рост культуры и разницы в сухой массе клеток при культивировании Y-4657-*uno YlCex1* в малом объеме по сравнению с родительским штаммом не наблюдали.

Дальнейшее повышение копияности гена *YlCex1* в ВКПМ Y-4657 приводит к ухудшению в полученном штамме Y-4657-*multi YlCex1* скорости роста клеток, понижению накопления как ИЛК, так и ЛК. Этот эффект может быть связан с тем, что в используемом штамме ВКПМ Y-4657 инактивирован митохондриальный транспортер цитрата *YlYhm2* и поступление цитрата в цитозоль из митохондрии значительно ограничено (возможность существования альтернативного минорного пути транспорта цитрата из митохондрии обсуждалось ранее [4]). Поскольку цитозольный цитрат критически важен для роста клетки и только в незна-

чительном количестве может секретироваться из нее, усиление активности *YlCex1* может приводить к дефициту цитозольного цитрата, требующегося для получения АсСоА, и как следствие дефициту цитозольного АсСоА и ухудшению роста клеток.

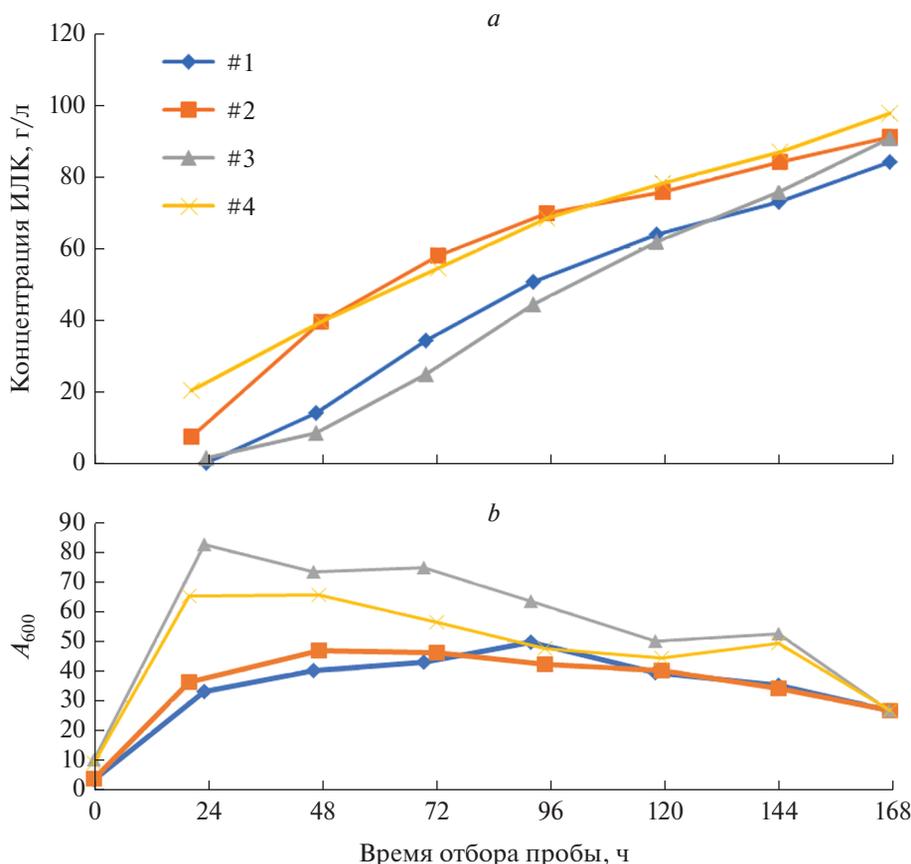
Альтернативным объяснением этого эффекта, может быть участие транспортера *YlCex1* в выведении из клетки также какого-то другого клеточного метаболита важного для ее роста и усиление транспорта этого метаболита может вызвать его дефицит в цитозоле и как следствие – ухудшение роста клетки.

Обнаруженный эффект ухудшения скорости роста клеток при избыточном усилении экспрессии транспортера *YlCex1*, безусловно, должен учитываться при конструировании промышленных продуцентов ИЛК, основанном на оптимизации экспрессии генов и подборе питательных сред.

#### Сравнение уровня синтеза ИЛК и ЛК штаммами ВКПМ Y-4657 и Y-4657-*uno YlCex1* при ферментации в 3 литровом ферментере

Поскольку сравнительное изучение влияния уровня активности гена *YlCex1* на синтез ИЛК и ЛК, проведенное в пробирках, позволило выявить позитивное влияние введения одной копии гена *YlCex1* на уровень ИЛК, то этот эффект был дополнительно изучен при ферментации штаммов ВКПМ Y-4657 и Y-4657-*uno-YlCex1* в 3 литровом ферментере как на среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода, так и на глюкозной среде с добавлением 4% кукурузного масла.

Интерес к изучению влияния добавления в глюкозную среду кукурузного масла связан с тем, что растительное масло является дополнительным источником цитозольного АсСоА, что может сокращать расходование транспортируемого из митохондрии ограниченного количества цитрата на получение, требующегося для клеточного роста АсСоА. Следует учитывать также, что продукты глубокой переработки кукурузы относятся к наиболее перспективным субстратам для использования в крупнотоннажной промышленной био-



**Рис. 1.** *a* – Динамика накопления ИЛК, *b* – кривые роста штаммов-продуцентов при ферментации в 3 литровых ферментерах; #1 – ВКПМ Y-4657, #2 – Y-4657-uno YICex1 в стандартных условиях, #3 – ВКПМ Y-4657, #4 – Y-4657-uno YICex1 при добавлении 4% кукурузного масла (об./об.) на старте ферментации.

**Fig. 1.** *a* – Dynamics of ICA accumulation, *b* – growth curves of cultivation in 3 liter bioreactors for producer strains; #1 – VKPM Y-4657, #2 – Y-4657-uno YICex1 under standard conditions; #3 – VKPM Y-4657 and #4 – Y-4657-uno YICex1 with the addition of 4% (v/v) corn oil at the start of fermentation.

технологии. Поскольку в процессе глубокой переработки кукурузы образуется более 70% глюкозы и около 5% кукурузного масла, его ограниченное добавление в культуральную среду на основе глюкозы при получении биомассы может быть экономически выгодно для производителей ЛК и ИЛК, если это будет связано с повышением уровня накопления целевого продукта и улучшением показателей конверсии субстрата в целевой продукт. Результаты исследования представлены в табл. 2 и на рис. 1.

Как следует из рис. 1а, процесс накопления ИЛК начинается примерно с 20 часа культивирования при выходе клеток из логарифмической стадии роста и лимиту по азоту в среде. Причем выход клеток из логарифмической стадии роста у Y-4657-uno YICex1 (#2 и #4), как на масле, так и без него начинается немного раньше, что может быть связано с большей активностью клеточного транспортера изоцитрата.

Наблюдаемое снижение уровня накопления биомассы на более поздних этапах ферментации, отличающееся в разных опытах, вероятно связано с разбавлением культуральной среды титрующим агентом (от 320 до 450 мл за период ферментации), причем добавляемое его количество зависило от уровня накопления в КЖ органических кислот.

Из представленных данных следует, что добавление кукурузного масла для обоих проверяемых штаммов приводит к улучшению роста клеток и увеличению накопления ИЛК в культуральной среде, причем введение дополнительной копии гена YICex1 незначительно снижает уровень накопления биомассы, что может быть связано с влиянием добавления масла и усиления транспорта цитрата на уровень цитозольного AcCoA.

Введение дополнительной копии гена YICex1 в штамм ВКПМ Y-4657 приводит к увеличению накопления ИЛК примерно на 4%, как на глюкозной среде так на глюкозной среде с добавлением

**Таблица 2.** Синтез ИЛК и ЛК штаммами ВКПМ Y-4657 и Y-4657-uno *Ycex1* при ферментации в 3 литровых ферментерах (результаты на 168 ч ферментации)

**Table 2.** Comparative study of ICA and CA synthesis by strains VKPM Y-4657 and Y-4657-uno *Ycex1* during fermentation in 3-liter bioreactors (results at 168 h of fermentation)

Штамм	Среднее значение сухого веса биомассы, г/л	Средняя скорость биосинтеза ИЛК, г/л/ч	Уровень накопления ИЛК на 168 ч, г/л	Уровень накопления ЛК на 168 ч, г/л	Соотношение ИЛК/ЛК	Конверсия ИЛК, %
ВКПМ Y-4657*	20 ± 1.2	0.57 ± 0.5	84.3 ± 4.5	6.08 ± 0.6	13.9	46.4 ± 1.9
Y-4657-uno- <i>Ycex1</i> *	18 ± 0.9	0.55 ± 0.4	91.1 ± 4.1	9.32 ± 0.6	9.8	50.8 ± 2.4
ВКПМ Y-4657**	28 ± 1.2	0.61 ± 0.6	90.6 ± 3.9	4.81 ± 0.4	18.8	62.7 ± 2.1
Y-4657-uno- <i>Ycex1</i> **	22 ± 1.1	0.52 ± 0.4	97.7 ± 4.2	5.51 ± 0.7	17.7	66.2 ± 2.5

Примечание. \* – глюкозная среда,

\*\* – глюкозная среда с добавлением 4% кукурузного масла.

Note. \* – glucose-based medium,

\*\* – glucose-based medium supplemented with 4% corn oil.

4% кукурузного масла, причем на последней среде наблюдается лучшее соотношение ИЛК /ЛК.

Полученные результаты свидетельствуют о значимости регулирования активности клеточного транспортера *Ycex1* в ходе генно-инженерного конструирования промышленных продуцентов ИЛК на основе *Yarrowia lipolytica*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в статье результаты подтвердили роль гена *Ycex1* в экспорте ИЛК из клетки в культуральную среду. Установлено, что добавление одной дополнительной копии *Ycex1* приводит к повышению уровня накопления ИЛК и конверсии глюкозы (50.8% у Y-4657-uno *Ycex1* против 46.4% у ВКПМ Y-4657). Однако, дальнейшее увеличение активности *Ycex1* дополнительное введение более трех копий гена *Ycex1* негативно сказывается на росте клеток, что может быть связано с образующимся дефицитом цитозольного АсСоА, требующегося для клеточного метаболизма.

Показано, что ограниченное добавление в культуральную среду кукурузного масла положительно влияет как на накопление ИЛК, так и на соотношение ИЛК/ЛК, причем для штамма с дополнительной копией гена *Ycex1* (Y-4657-uno *Ycex1*) этот эффект оказался более выраженным. Полученные результаты могут быть полезными в дальнейшем при конструировании промышленных штаммов- продуцентов ИЛК.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Статья написана Дементьевым Д.А. и ее текст прочитан, отредактирован и одобрен всеми авторами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Изолимонная кислота. *Большая российская энциклопедия. научно-образовательный портал.* 2022. <https://bigenc.ru/c/izolimonnaia-kislota-b9e0dc/?v=3912341>.
2. Kamzolova S.V., Morgunov I.G. Microbial production of (2 R, 3 S)-isocitric acid: state of the arts and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103(23), 9321–9333. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10207-4>
3. Дементьев Д.А., Рыбаков Ю.А., Синеокий С.П. Перспективы развития биотехнологий получения лимонной кислоты. *Биотехнология*, 2023, 39(5), 24–32. <https://doi.org/10.56304/S023427582305006X>
4. Yuzbasheva E.Y., Agrimi G., Yuzbashev T.V., Scarcia P., Vinogradova E.B., Palmieri L., Sineoky S.P. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: Its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid. *Metab. Eng.*, 2019, 54, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.002>
5. Yuzbasheva E.Y., Scarcia P., Yuzbashev T.V., Messina E., Kosikhina I.M., Palmieri L., Agrimi G. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the selective and high-level production of isocitric acid through manipulation of mitochondrial dicarboxylate–tricarboxylate carriers. *Metab. Eng.*, 2021, 65, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.11.001>
6. Erian A.M., Egermeier M., Rassinger A., Marx H., and Sauer M. Identification of the citrate exporter *Cex1* of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.*, 2020, 20(7), foaa055. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa055>
7. Юзбашева Е.Ю., Юзбашев Т.В., Лантев И.А., Косихина Ю.М., Виноградова Е.В., Таратынова М.О.,

- Шутов А.В., Дементьев Д.А. Синеокий С.П. Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica*, продуцирующий изолимонную кислоту: пат. Патент RU2757603, бюлл. № 29, опубл. 19.10.2021.
8. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Melkina O.E., Patel D., Bubnov D., Dietz H., & Ledesma-Amaro R. A DNA assembly toolkit to unlock the CRISPR/Cas9 potential for metabolic engineering. *Commun. Biol.*, 2023, 6(1), 858.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-023-05202-5>
  9. Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 2nd edition. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.
  10. Yuzbasheva E.Y., Mostova E.B., Andreeva N.I., Yuzbashev T.V., Laptev I.A., Sobolevskaya T.I., Sineoky S.P. Co-expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and acyl-CoA binding protein enhances lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *N. Biotechnol.*, 2017, 39, 18–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.008>
  11. Blazcek J., Liu L., Redden H., & Alper H. Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(22), 7905–7914.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.05763-11>
  12. Nicaud J.M., Madzak C., van den Broek P., Gysler C., Duboc P., Niederberger P., Gaillardin C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS yeast research*, 2002, 2(3), 371–379.  
[https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00082-X)
  13. Laptev I.A., Filimonova N.A., Allayarov R.K., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A., Sineoky S.P., Morgunov I.G. New recombinant strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* with overexpression of the aconitate hydratase gene for the obtainment of isocitric acid from rapeseed oil. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2016, 52, 699–704.  
<https://doi.org/10.1134/S000368381607005X>
  14. Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A., Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 2009, 6(5), 343–345.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>

## Investigation of the Role of the *YCex1* Gene in *Yarrowia lipolytica* in the Transport of Isocitric Acid out of the Cell and the Efficiency of Using Combined Nutrient Media

D. A. Dementev<sup>a, b, #, ##</sup>, T. A. Khabibullin<sup>a, b</sup>, A. A. Kolobov<sup>a, b</sup>, A. A. Korneeva<sup>a, b</sup>, and S. P. Sineoky<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Bioresource Centre All-Russian Collection of Industrial Microorganisms of the National Research Centre ‘Kurchatov Institute’, Moscow, 117545 Russia

<sup>b</sup>National Research Centre “Kurchatov institute”, Moscow, 123182 Russia

<sup>#</sup>e-mail: dmitry@dementiev-da.ru

<sup>##</sup>e-mail: nrcki@nrcki.ru

**Abstract**—The yeast *Yarrowia lipolytica* is currently the most promising platform for the development of an effective biotechnology for the production of industrially valuable isocitric acid (ICA), which is a component of some fruit juices and has a number of valuable properties in contrast to citric acid (CA). The development of yeast producers of ICA is based on the study of the genetic control of its synthesis and the use of genetic and metabolic engineering methodology for targeted genetic modification of various stages of synthesis and cellular transport of ICA. The role of *YCex1* gene, a transporter of CA and ICA from the cell, was studied. The effect of using combined nutrient media based on glucose molasses on the efficiency of ICA synthesis was investigated.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, *YCex1*, isocitric acid (ICA), citric acid (CA), corn oil