

УДК 579.66

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МАНИПУЛЯЦИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО  
МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТЕР ЦИТРАТА, НА ПРОДУКЦИЮ ОРГАНИЧЕСКИХ  
КИСЛОТ ДРОЖЖАМИ *YARROWIA LIPOLYTICA***

**Ю.М. Косихина, Е.Ю. Юзбашева, А.В. Шутков, М.О. Таратынова, С.П. Синеокий**

*Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных  
микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт, Москва, Россия*

Органические кислоты по объему производства являются одним из главных продуктов микробного синтеза и имеют широкое применение в сельскохозяйственной, пищевой, фармацевтической и химической промышленности. Лимонная кислота широко применяется в сельском хозяйстве, в пищевой, фармацевтической и химической промышленности. Изолимонная кислота может быть использована для создания препаратов для профилактики и лечения гипоксии.

Известно, что природные изоляты дрожжей вида *Yarrowia lipolytica* непатогенны, пригодны для пищевых продуктов и также способны продуцировать смесь лимонной и изолимонной кислот в условиях избытка углерода и голодания по азоту, фосфору или сере. В качестве источника углерода они используют глюкозу, спирты, ацетаты и гидрофобные субстраты (такие как алканы, жирные кислоты и масла). Следует отметить, что источник углерода определяет соотношение концентраций лимонной и изолимонной кислот в их смеси. Так, при культивировании на глюкозе *Y. lipolytica* продуцирует преимущественно лимонную кислоту [1]. При культивировании на гидрофобных субстратах продукция лимонной кислоты значительно снижается и соотношение органических кислот смещается в сторону изолимонной кислоты [2]. Синтез лимонной и изолимонной кислот происходит в результате реакций цикла Трикарбоновых кислот в митохондриях. Внутренняя мембрана митохондрии непроницаема для интермедиантов цикла Трикарбоновых кислот. Транспорт метаболитов через внутреннюю мембрану митохондрии в цитозоль осуществляется с помощью белков, принадлежащих к семейству митохондриальных транспортеров. Нами был выявлен и охарактеризован главный митохондриальный транспортер цитрата в дрожжах *Y. lipolytica* (YlYhm2p) [3]. Целью данного исследования было изучение влияния повышения экспрессии, а также инактивации гена YlYHM2 в дрожжах *Y. lipolytica* на продукцию лимонной и изолимонной кислот при культивировании на глюкозе и оливковом масле.

Были сконструированы рекомбинантные штаммы *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4221 (YlYHM2) и ВКПМ Y-3178 ( $\Delta$ YlYhm2), характеризующиеся, как усилением уровня экспрессии гена YlYHM2, так и инактивацией данного гена, соответственно. Культивирование проводилось в лабораторном ферментере с рабочим объемом 500 мл в минимальной среде с лимитом по азоту и избытком глюкозы или оливкового масла в качестве единственного источника углерода. Продукция лимонной кислоты штаммом ВКПМ Y-4221 (YlYHM2) на среде с глюкозой составила 97.1 г./л, что превосходило на 32.7 % уровень продукции лимонной кислоты для контрольного штамма ВКПМ Y-4221. Накопление изолимонной кислоты штаммом ВКПМ Y-4221 (YlYHM2) наоборот снизилось более чем в 1.4 раза по сравнению с таковым для штамма ВКПМ Y-4221 и составило 6.0 г./л. При культивировании на среде с оливковым маслом штамм ВКПМ Y-3178 ( $\Delta$ YlYhm2) накапливал 89.3 г./л изолимонной кислоты, тогда как контрольный штамм ВКПМ Y-3178 в этих условиях продуцировал 54.1 г./л изолимонной кислоты. При этом продукция лимонной кислоты штаммами ВКПМ Y-3178 ( $\Delta$ YlYhm2) и ВКПМ Y-3178 составила 17.1 г./л и 35.4 г./л, соответственно. Таким образом, путем инактивации гена, кодирующего митохондриальный транспортер цитрата, удалось увеличить соотношение концентраций изолимонной кислоты к лимонной кислоте в 3.4 раза с 1.5:1, характерного для контрольного штамма ВКПМ Y-3178, до 5.2:1 для штамма ВКПМ Y-3178 ( $\Delta$ YlYhm2). Полученный результат превосходит лучшие данные по соотношению концентраций изолимонной кислоты к лимонной, опубликованные ранее в научной литературе и равные 4.3:1 [2].

В результате проведенной работы было продемонстрировано, что повышение уровня экспрессии гена YlYHM2 приводит к увеличению продукции лимонной кислоты при культивировании дрожжей *Y. lipolytica* на глюкозе в качестве единственного источника углерода. При инактивировании гена YlYHM2, в свою очередь, наблюдается значительное увеличение продукции изолимонной кислоты и снижение накопления лимонной кислоты при культивировании на среде, содержащей оливковое масло.

*Работа выполнена при финансовой поддержке государства (Государственное задание № 595–00003–19 ПР) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cavallo E. et al. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production / FEMS yeast research. 2017. Т. 17. №. 8. С. fox084.
2. Kamzolova S.V. et al. Isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast / Applied microbiology and biotechnology. 2013. Т. 97, №. 20. с. 9133–9144.
3. Yuzbasheva E.Y. et al. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: Its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid / Metabolic engineering. 2019. Т. 54. с. 264–274.