

Кроме того, достоверные снижения антифунгальной активности к двадцатым суткам инкубации отмечены для вариантов с применением Твин-60, Глицерет-26 и ПЭГ-36 КМ. Твин-80, Лаурет-2 и Глицерет-12 показали способность к увеличению антифунгальной активности штамма *B. velezensis* BZR 336g в течение всего периода инкубации. Штамм BZR 517 демонстрировал в целом более высокую и стабильную антифунгальную активность по сравнению с BZR 336 g. Наибольшее снижение активности по сравнению с контролем отмечено в варианте Глицерет-12. Снижение активности к 20-м суткам отмечено и в вариантах с ПЭГ-300 и ПЭГ-36 КМ. Также Твин-60 демонстрирует относительно низкие значения на 15-е и 20-е сутки.

Таким образом, наиболее оптимальными для штамма *B. velezensis* BZR 336g признаны ПЭГ-300, ПЭГ-400 и Лаурет-2, для штамма *B. velezensis* BZR 517 – ПЭГ-200, ПЭГ-400, Твин-80, Твин-60.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке эффективных формуляций биопрепаратов с пролонгированным действием и улучшенными физико-химическими свойствами.

Исследования выполнены согласно Государственному заданию Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № FGRN-2025-0003.

Литература

1. Borger C.P.D., Riethmuller G.P., Ashworth M., Minkey D., Hashem A., Powles S.B. Increased carrier volume improves preemergence control of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in zero-tillage seeding systems // *Weed Technol.* 2013. V. 27. № 4. P. 649–655.
2. Adetunji C.O., Jeevanandam J., Inobeme A., Olaniyan O.T., Anani O.A., Islam D.T.S. Application of bio-surfactant for the production of adjuvant and their synergetic effects when combined with different agro-pesticides // *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*. Amsterdam: Elsevier, 2021. P. 255–277.
3. Eras-Muñoz E., Farré A., Sánchez A., Font X., Ge T. Microbial biosurfactants: A review of recent environmental applications // *Bioengineered*. 2022. V. 13. № 5. P. 12365–12391.
4. de Almeida D.G., da Silva M.D., do Nascimento Barbosa R., de Souza Pereira Silva D., da Silva R.O., de Souza Lima G.M., de Gusmão N.B., de Queiroz Sousa M.F.V. Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2017. V. 116. P. 73–82.
5. Ваксман З.А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества. Москва: Гос. изд-во иностр. лит., 1947. 377 с.
6. Асатурова А.М. Изучение кинетики роста штаммов бактерий-антагонистов возбудителей фузариоза при периодическом культивировании // *Масличные культуры: науч.-техн. бюл. ВНИИМК*. 2008. Вып. 1 (138). С. 79–82.
7. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие. Москва: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.

УДК 636.5.034

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-3-33-36>

АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТЕОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ ШТАММА *YARROWIA LIPOLYTICA* RO1F И ЕГО ТРАНСФОРМАНТА С ИНТЕГРИРОВАННОЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ФИТАЗОЙ ИЗ *PAENIBACILLUS* SP.

Исакова Е.П., Просвирин А.М., Кляйн О.И., Бирюкова Ю.К., Дерябина Ю.И.

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* являются биотехнологически значимым микроорганизмом, так как непатогенны, способны расти на широком диапазоне малоценных субстратов и отходах производств, повышают пищевую ценность продуктов [1, 2]. Эти дрожжи могут являться источником полиненасыщенных жирных кислот и некоторых витаминов, белков, липидов, других полезных биологически активных веществ. Также дрожжи *Y. lipolytica* нашли применение в производстве рекомбинантных белков для кормовых добавок, таких как целлюлазы, ксиланазы, фитазы. Важным их преимуществом для трансформации является хорошо аннотированный геном. Введение фитаз в рацион животных позволяет решить ряд проблем. Фитазы увеличивают высвобождение фосфора из фитатов – основной формы органического фосфора в кормах растительного происхождения, что способствует усвоению других питательных веществ корма, увеличивает конверсию корма, снижает экономические затраты [1, 2]. Экологическим аспектом использования фитазы является снижение количество фосфатов, попадающих в водоемы со сточными водами, как следствие, снижается эвтрофикация.

Актуальным направлением биотехнологии является создание кормовых добавок, содержащих фитазы с широким диапазоном pH, термоустойчивостью и высокой активностью [1, 2]. В связи с этим были предприняты попытки разработать штамм-продуцент внутриклеточной фитазы путем вставки плазмиды, несущей ген фитазы, в экологически безопасные дрожжи *Y. lipolytica*. Введение бактериальных фитаз в геном *Y. lipolytica* позволил получить несколько продуцентов для кормовой базы. Так, на основе гистидиновой кислой фитазы *Obesumbacterium proteus* был получен трансформант Polf pUV3-Op, который прошел производственные испытания на цыплятах-бройлерах и перепелах и показал эффективность ферментного препарата [3-5]. Также был создан новый трансформант на основе бактериальной β -пропеллерной фитазы *Paenibacillus sp.*, обладающий внутриклеточной активностью. Протеомный анализ позволяет оценить, каким образом вставка плазмиды в типовой штамм дрожжей влияет на изменения в белковом профиле и, как следствие, метаболических путях. Целью представленного исследования является оценка дифференциальных протеомных профилей диких штаммов *Y. lipolytica* Polf и полученного на его основе трансформанта *Y. lipolytica* 42-Y-Ps.

В работе использовался штамм экстремофильного вида дрожжей *Y. lipolytica* Polf, полученного из коллекции CIRMLevures (Франция). Дрожжи культивировали на минимальной полусинтетической среде YNB с глицерином (0,6–1%) в качестве основного источника углерода, при pH 4,0, 5,5 и 9,0, как показано в работе [6]. Биомассу дрожжей собирали на стадии стационарной фазы роста (48 ч. культивирования), центрифугировали при 4000g в течение 10 мин. Для приготовления белковых экстрактов 100 мг клеточного осадка переносили во флакон, содержащий 2 мл лизирующего буфера (9 М мочевины, 5 % β -меркаптоэтанол, 2 % Тритон X-100 и 2 % амфолиты, pH 3,5–10 («Sigma», США)) и тщательно суспендировали. Образец обрабатывали ультразвуком в ультразвуковом дезинтеграторе (MSE-Pharmacia, Швеция) в течение 2 минут (4 цикла по 30 секунд каждый). Гомогенат осветляли центрифугированием в микроцентрифуге в течение 20 минут на максимальной скорости. Осадок удаляли, а 100 мкл прозрачной надосадочной жидкости использовали для изоэлектрофокусирования (ИЭФ). Приготовление белковых экстрактов, их фракционирование методом двумерного электрофореза по О'Фарреллу (2DE) с собственными модификациями и анализ электрофореграмм проводили, как описано ранее [7, 8]. Полученные белковые пятна анализировали методом MALDI-TOF MS – анализа на Ultraflextreme MALDI-TOF масс-спектрометре (Bruker Daltonics Inc., USA).

В результате экстракции белковой фракции из 2 г сырой биомассы удалось выделить для штамма *Y. lipolytica* Polf – 336 мг, для трансформанта *Y. lipolytica* 42-Y-Ps – 224 мг. Таким образом, вставка плазмиды привела к сокращению количества внутриклеточного белка у трансформанта на треть по сравнению с исходным типовым штаммом Polf. Для экстрагированных внутриклеточных белков был выполнен двумерный электрофорез с нагрузкой 14 мг белков на пластину геля. Чтобы проследить изменения в минорных количествах белка, электрофореграммы с нагрузкой 7 мг белка на пластину геля проявляли с помощью азотнокислого серебра. Визуальный анализ всех фотографий электрофореграмм позволил выделить зоны, различающиеся по интенсивности окраски, что было отчетливо видно по 3D диаграммам (на основе гелей, окрашенных серебром), построенных с помощью плагина «Interactive 3D Surface Plot» в программе Fiji [9]. Таким образом, оптимизация метода двумерного фракционирования белков электрофорезом по нагрузке пластины ПААГ позволила более точно оценить относительное содержание белков в перекрывающихся зонах и уточнить протеомные карты.

Выделенные зоны были исследованы на параметр оптической плотности. При расчете использовались только те участки электрофореграммы, на которых присутствовали белковые фракции, разделенные двумерным электрофорезом. Для каждой зоны вычислялось интегральное значение интенсивности и относилось к интегральному значению всех белковых фракций. Данные представлены в таблице 1.

Были выявлены модификации белков, а именно, у белков №16, №19, 21, 22 – ацетилирование N-конца; у белка №26 – деамидирование и Cyano, MG-H1. Модификации были определены с помощью программного обеспечения Mascot. Мы обнаружили, что экспрессия подавляющего большинства представленных в таблице белков увеличивалась у трансформанта (Таблица 1). Исключение составили белки зоны 21 (смесь Putative cytochrome c peroxidase, mitochondrial (Acetyl (Protein N-term)) и F-actin-capping protein subunit beta (Acetyl (Protein N-term)) и зоны 4 (YALI0F17842p (Peptidase M20 dimerisation domain-containing protein)), экспрессия которых уменьшалась примерно в 4 и 2,4 раза, соответственно, по отношению к контрольному штамму *Y. lipolytica* Polf. Протеолитические ферменты, как известно, катализируют гидролиз пептидных связей в клеточных белках. Для полного расщепления белков до свободных аминокислот необходимо несколько ферментов с различной специфичностью. Протеиназы и пептидазы

«узнают» и связывают короткие пептидные последовательности субстратов и относительно специфично гидролизуют связи между определенными аминокислотными остатками. Экзопептидазы гидролизуют пептиды с конца цепи: аминопептидазы — с N-конца, карбоксипептидазы — с C-конца [10]. Таким образом, мы обнаружили, что у трансформанта *Y. lipolytica* 42-Y-Ps снижена экспрессия некоторых белков, участвующих в процессах убиквитинирования и протеолиза, что косвенно может подтверждать высокую способность исследуемого штамма к производству гетерологичной фитазы внутри клетки. Кроме того, пептидазы имеют выраженное функциональное взаимодействие с ферментами глутатионовой системы, обладающими глутатионгидролазной активностью, что подтверждает, что баланс в гидролизе глутатиона и его синтезе, как можно предположить, формирует нативное состояние дисульфидных мостиков в молекуле фитазы и обеспечивает ее стабильное функционирование.

Таблица 1 – Денситометрия зон, различающихся по интенсивности окраски

Зона	Наименование белка согласно базе UniProt	% содержания от количества суммарного белка, разделенного по двумерному электрофорезу	
		<i>Y. lipolytica</i> Po1f	<i>Y. lipolytica</i> 42-Y-Ps
4	YALI0F17842p (Peptidase M20 dimerisation domain-containing protein)	0,327	0,136
6	2-methylcitrate synthase, mitochondrial	0,344	0,409
8	D-lactate dehydratase	0,172	0,280
10***	Probable thiopurine S-methyltransferase YALI0B03366p (Phosphatidylethanolamine-binding protein) (Carboxypeptidase Y inhibitor)	0,338	0,600
16***	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase YALI0E12573p (Acyl-CoA dehydrogenase/oxidase) Short-chain 2-methylacyl-CoA dehydrogenase YALI0B15840p (Activator of Hsp90 ATPase)	0,202	0,440
17	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0,029	0,055
18***	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase YALI0F00638p (NTF2 domain-containing protein) YALI0D01573p (Mycelial growth factor-1)	0,029	0,146
19***	Peroxisomal catalase YALI0A18007p (mRNA export factor MEX67) methylcrotonoyl-CoA carboxylase SEC14 cytosolic factor (PI/PC TP)	0,032	0,133
20***	Peroxisomal catalase deamidated SEC14 cytosolic factor (PI/PC TP)	0,052	0,266
21***	Putative cytochrome c peroxidase, mitochondrial Acetyl (Protein N-term) F-actin-capping protein subunit beta Acetyl (Protein N-term)	0,312	0,078
22***	Hsp70 nucleotide exchange factor FES1 Acetyl (Protein N-term) YALI0E33121p (Unch. protein), RNA-dependent processing	0,021	0,076
24***	D-lactate dehydratase SulfurDioxide YALI0D00737p (Subunit NUHM of protein NADH:Ubiquinone oxidoreductase)/ (NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit)	0,065	0,433
25	YALI0F22121p (ClpP/crotonase-like domain-containing protein)	0,057	0,125
26***	YALI0E25091p (Thioredoxin domain-containing protein) Cyano MG-H1 Guanylate kinase	0,105	0,257
27***	YALI0C03443p (HSP20-like chaperone) Nucleoside diphosphate kinase	0,104	0,382

*** Зоны, представленные в виде смеси белков.

Были выявлены модификации белков, а именно, у белков №16, №№19, 21, 22 – ацетилирование N-конца; у белка №26 – деамидирование и Суано, MG-H1. Модификации были определены с помощью программного обеспечения Mascot. Мы обнаружили, что экспрессия подавляющего большинства представленных в таблице белков увеличивалась у трансформанта (Таблица 1). Исключение составили белки зоны 21 (смесь Putative cytochrome c peroxidase, mitochondrial (Acetyl (Protein N-term)) и F-actin-capping protein subunit beta (Acetyl (Protein N-term))) и зоны 4 (YALI0F17842p (Peptidase M20

dimerisation domain-containing protein), экспрессия которых уменьшалась примерно в 4 и 2,4 раза, соответственно, по отношению к контрольному штамму *Y. lipolytica* Polf. Протеолитические ферменты, как известно, катализируют гидролиз пептидных связей в клеточных белках. Для полного расщепления белков до свободных аминокислот необходимо несколько ферментов с различной специфичностью. Протеиназы и пептидазы «узнают» и связывают короткие пептидные последовательности субстратов и относительно специфично гидролизуют связи между определенными аминокислотными остатками. Экзопептидазы гидролизуют пептиды с конца цепи: аминопептидазы — с N-конца, карбоксипептидазы — с C-конца [10]. Таким образом, мы обнаружили, что у трансформанта *Y. lipolytica* 42-Y-Ps снижена экспрессия некоторых белков, участвующих в процессах убиквитинирования и протеолиза, что косвенно может подтверждать высокую способность исследуемого штамма к производству гетерологичной фитазы внутри клетки. Кроме того, пептидазы имеют выраженное функциональное взаимодействие с ферментами глутатионовой системы, обладающими глутатионгидролазной активностью, что подтверждает, что баланс в гидролизе глутатиона и его синтезе, как можно предположить, формирует нативное состояние дисульфидных мостиков в молекуле фитазы и обеспечивает ее стабильное функционирование.

Наиболее значительно, в 4 и более раз, экспрессия белков увеличивалась в зонах 18, 19, 20 и 24 (таблица 1). В составе смеси белков в зоне № 19 и № 20 были обнаружены пероксисомальная каталаза и митохондриальная цитохром с-пероксидаза (Таблица 1). Можно предположить, что активация антиоксидантной защиты в клетках трансформанта способствует наиболее благоприятным условиям синтеза и фолдинга гетерологичной фитазы. Также в зоне № 24 было обнаружено увеличение плотности белкового пятна, содержащего НАДН:убихиноноксидоредуктазу, что может свидетельствовать об активации энергетических процессов у трансформанта.

Таким образом, в ходе анализа протеомных профилей 2 штаммов дрожжей *Y. lipolytica* было показано, что белковый состав трансформанта *Y. lipolytica* 42-Y-Ps обладает рядом метаболических особенностей, которые позволяют ему, с одной стороны, успешно синтезировать и накапливать в клетках гетерологичный полностью функциональный целевой фермент, а с другой – включать механизмы ответа на эндогенный стресс, вызванный активным синтезом и фолдингом чужеродного белка за счет умеренного подавления процессов протеасомной деградации и активации антиоксидантной защиты.

Работа выполнена при поддержке проекта Российского научного фонда № 22-16-00093-П, соглашение от 10 июня 2025 г.

Литература

1. Madzak C. Yarrowia lipolytica strains and their biotechnological applications: How natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement // J. Fungi. 2021. V. 7. № 7. P. 548.
2. Groenewald M., Boekhout T., Neuvéglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W., Wyss M. Yarrowia lipolytica: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential // Crit. Rev. Microbiol. 2014. V. 40. № 3. P. 187–206.
3. Сердюк Е.Г., Исакова Е.П., Гесслер Н.Н., Трубникова Е.В., Антипов А.Н., Дерябина Ю.И. Активность нейтральной фитазы из *Obesumbacterium proteus* в рекомбинантных штаммах дрожжей *Yarrowia lipolytica* при культивировании на низкосортных растительных субстратах // Прикл. биохим. микробиол. 2019. Т. 55. № 5. С. 498–505.
4. Danilova M.A., Epova E.Y., Trubnikova E.V., Badrutdinov N.V., Kokoreva A.S., Pusev M.S., Deryabina Y.I., Isakova E.P. Encapsulated Phytase Produced by Recombinant Yarrowia lipolytica Exhibits High Efficiency on Broiler Chickens in Low Dosage // Appl. Sci. 2022. V. 12. № 24. P. 11999.
5. Ovseychik E.A., Klein O.I., Gessler N.N., Deryabina Y.I., Lukashenko V.S., Isakova E.P. The Efficacy of Encapsulated Phytase Based on Recombinant Yarrowia lipolytica on Quails' Zootechnic Features and Phosphorus Assimilation // Vet. Sci. 2024. V. 11. № 1. P. 91.
6. Sekova V.Y., Dergacheva D.I., Isakova E.P., Gessler N.N., Tereshina V.M., Deryabina Y.I. Soluble sugar and lipid readjustments in the Yarrowia lipolytica yeast at various temperatures and pH // Metabolites. 2019. V. 9. № 12. P. 307.
7. Kovalyova M.A., Kovalyov L.I., Serebryakova M.V., et al. Age-Related Changes in Albumin and Actin of Human Myocardium // Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. 2008. V. 2. № 2. P. 160–165.
8. Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S., et al. The major protein expression profile and two-dimensional protein database of human heart // Electrophoresis. 1995. V. 16. P. 1160–1169.
9. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
10. Obaha A., Novinec M. Regulation of Peptidase Activity beyond the Active Site in Human Health and Disease // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 23. P. 17120.