

УДК 576.8.095

И.А. ЛАПТЕВ^{1,*}, Н.А. ФИЛИМОНОВА¹, Р.К. АЛЛАЯРОВ², С.В. КАМЗОЛОВА², В.А. САМОЙЛЕНКО²,
С.П. СИНЕОКИЙ¹, И.Г. МОРГУНОВ²

¹ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

²ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» РАН (ИБФМ РАН), Пущино, Московская область, 142290

e-mail: ivanlaptev@mail.ru

Новые рекомбинантные штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica* с суперэкспрессией гена аконитат-гидратазы для получения изолимонной кислоты из рапсового масла

При лимитировании роста азотом дрожжи *Yarrowia lipolytica* способны к высокоинтенсивному синтезу (сверхсинтезу) лимонной (ЛК) и изолимонной (ИЛК) кислот. Соотношение синтезируемых кислот зависит от используемых штаммов-продуцентов и определяется уровнем экспрессии аконитат-гидратазы. На основе природного штамма *Y. lipolytica* 672 — продуцента ИЛК сконструированы рекомбинантные варианты с суперэкспрессией мультикопийного гена аконитат-гидратазы *ACO1*. При последующей селекции отобран рекомбинантный штамм *Y. lipolytica* № 20, у которого осуществляется сдвиг отношения изоцитрат—цитрат в сторону ИЛК до соотношения 2,3:1 в отличие от соотношения у природного штамма *Y. lipolytica* 67, равного 1,1:1. При культивировании в ферментере объемом 10 л рекомбинантный штамм *Y. lipolytica* № 20 синтезировал 72,6 г/л ИЛК и 29,0 г/л ЛК при соотношении изоцитрат—цитрат 2,5:1, что позволяет считать полученный рекомбинантный штамм перспективным для использования в создании промышленного процесса получения изоцитрата.

Ключевые слова: дрожжи *Yarrowia lipolytica*, изолимонная кислота, аконитат-гидратаза, суперэкспрессия гена *ACO1*.

Изолимонная кислота при достаточных масштабах производства может найти широкое применение как реактив в биохимических исследованиях, в пищевом производстве (в частности, как маркер аутентичности соков), медицине и сельском хозяйстве [1—4]. Наряду с традиционным применением органических кислот в различных сферах производства рассматривается их исполь-

зование в качестве «строительных блоков» для получения ряда важных соединений технического, пищевого и медицинского назначения.

В настоящее время ИЛК производится только путем химического синтеза. Это соединение существует в виде четырех изомеров и только один из них — трео-Ds-изолимонная кислота — является природным компонентом, который присутству-

Лаптев Иван Александрович, Филимонова Нина Александровна, Аллаяров Рамиль Камильевич, Камзолова Светлана Владиславовна, Самойленко Владимир Александрович, Синеокий Сергей Павлович, Моргунов Игорь Григорьевич.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ИЛК — изолимонная кислота; КЖ — культуральная жидкость; ЛК — лимонная кислота; ОФ-ВЭЖХ — обращенно-фазовая ВЭЖХ; ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда LB — среда Лурия—Бертани; т.п.н. — тысяч пар нуклеотидов.

* Автор для переписки.

ет в каждой живой клетке. При химическом синтезе ИЛК получается рацемическая смесь стереоизомеров, разделить которые химическими методами не представляется возможным. ИЛК может накапливаться в относительно больших количествах в листьях и стеблях некоторых растений, например, семейства толстянковые (*Crassulaceae*), плодах ежевики, черной смородины и др. Но выделение природной ИЛК из соков растений или фруктов, содержащих широкий спектр органических кислот и других компонентов, является сложным и чрезвычайно дорогим технологическим процессом. В связи с этим исключительную важность приобретает разработка биотехнологических процессов получения ИЛК.

Впервые способность дрожжей *Y. lipolytica* синтезировать ИЛК из n-алканов была обнаружена в ИБФМ РАН в 1966 г.; затем был изучен механизм биосинтеза данной кислоты при росте дрожжей на этаноле [4, 5]. Но использование в качестве субстратов токсичных для клеток (этанол) или непищевых (n-алканы) субстратов затрудняло разработку технологического процесса и не позволяло получать целевой продукт пищевого и медицинского назначения. Использование новых субстратов и новых штаммов-продуцентов может сделать процесс микробной продукции ИЛК более эффективным и получать целевой продукт с более высоким выходом и качеством.

Сравнительно недавно нами были представлены данные о синтезе ИЛК из рапсового и подсолнечного масел (экономичного сырья, являющегося отходом прямого отжима и используемого без очистки) и глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива [6—11]. Известно, что при образовании ИЛК ей всегда сопутствует ее изомер — ЛК; оба продукта накапливаются в среде культивирования приблизительно в равных количествах. Эти данные были подтверждены и в работах немецких ученых [2, 3, 12, 13]. До последнего времени не удавалось разработать направленный процесс биосинтеза ИЛК с минимальным содержанием ЛК. В основном соотношение синтезируемых кислот зависит от особенностей метаболизма используемых штаммов-продуцентов, применяемого источника углерода, а также позитивно коррелирует с уровнем экспрессии гена аконитат-гидратазы.

Целью настоящей работы было получение новых рекомбинантных штаммов дрожжей *Y. lipolytica* с повышенным числом копий гена *ACO 1*, кодирующего аконитат-гидратазу, и использование их для разработки процесса направленного синтеза ИЛК из рапсового масла.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты исследования. Исходной культурой для получения рекомбинантных продуцентов ИЛК являлся природный штамм дрожжей *Y. lipolytica* 672, полученный из коллекции лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН, способный к сверхсинтезу лимонных кислот при росте на рапсовом масле [9]. В работе также применяли штаммы, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ГосНИИгенетика: *Y. lipolytica* W29 (штамм дикого типа), *Y. lipolytica* E150 (*MAT B*, *his1*, *leu2-270*, *ura3-302*, *xpr2-322*) и штамм *Escherichia coli* DH5 α [*F⁻ endA1*, *hdsR17*(*r_k⁻ m_k⁻*), *supE44*, *thi-1*, λ^{-} , *recA1*, *gyrA96*, *relA1*].

Среды. Для роста *E. coli* использовали среду LB: триптон — 10 г/л; дрожжевой экстракт — 5 г/л; NaCl — 5 г/л (HiMedia, Индия). Бактерии выращивали при 37°; если необходимо, добавляли ампициллин (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл.

Дрожжевые штаммы растили на следующих средах: а) среда Ридер, г/л: (NH₄)₂SO₄ — 0,3; MgSO₄·7H₂O — 0,7; Ca(NO₃)₂ — 0,4; NaCl — 0,5; KH₂PO₄ — 1,0; K₂HPO₄ — 0,1; рапсовое масло — 10; дрожжевой экстракт Difco — 0,5; микроэлементы по Буркгольдеру (Sigma); б) среда YNB (HiMedia, Индия) с добавлением урацила (Sigma) (40 мкг/мл); в) среда YPD: пептон — 20 г/л, дрожжевой экстракт — 10 г/л, глюкоза — 10 г/л (HiMedia).

Манипуляции с ДНК осуществляли согласно [14].

Очистку фрагментов ДНК из геля проводили с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США).

Олигонуклеотиды синтезировали на автоматическом приборе BIOSSET ASM 800 (Россия) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В табл. 1 представлен список олигонуклеотидов, использованных в работе.

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

Первичную структуру ДНК определяли с использованием автоматического секвенатора ABI 3500 (Applied Biosystems, США).

Электрофоретический анализ белков осуществляли по методу Laemmli [15].

Культивирование микроорганизмов. С целью селекции продуцентов ИЛК рекомбинантные штаммы выращивали при температуре 29—30° на качалке (180—200 об/мин) в колбах

Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название праймера	Синтезируемый фрагмент	Матрица для синтеза	Последовательность (5'→3')
pUC19-F	Часть вектора pUC19	pUC19	<u>CGCCCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGT</u> <u>GCGCGGAACC</u>
pUC19-R			GAGAATCGGCGTTACCTCCTCA CAAAGCCCTT CAGTGC GGCCGCAGCTTGGCGTAATCATGG
Zeta-up-F	Zeta upstream	<i>Yarrowia lipolytica</i> E150 (CLIB122)	GGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACC TGGGGCGGCCGCTGTCGGGAACCGCGTTCAGG
Zeta-up-R			CATTATACGAACGGTATCGATAAAAGTGCTTTGT GCGTACC
Ura3d4-F	Маркер ura3d	<i>Yarrowia lipolytica</i> W29 (CLIB89)	GGTACGCACAAAGCACTTTATCGATA CCGTTTCG TATAATGTATGCTATACGAAGTTATCGACAAAAG <u>GCCTGTTTCTCG</u>
Ura3d4-R			TTATACGAAGT TATGCCCTCCTACGAAGCTCGA GCTAACG
ACO1-F	Ген <i>ACO1</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i> W29 (CLIB89)	CGTTAGCTCGAGCTTCGTAGGAGGGCATAACTTC GTATAATGTATGCTATACGAACGGTAGCTAGCGA <u>CATGGCTCCTGCACTTC</u>
ACO1-R			GAAAGGATGAGGACCACTAATACTACACCCCT CAACTTA
Zeta-dn-F	Zeta downstream	<i>Yarrowia lipolytica</i> E150 (CLIB122)	TAAGTTGAGGGGTGTAGTATTAGTGGTCCTCATC CTTTCGAAGGCATGTGTAACA CTCGCTCTGG
Zeta-dn-R			CCGCACTGAAGGGCTTTGTGA GGAGGTAACGCC GATTCTC

Примечание: подчеркнуты искусственно введенные сайты рестрикции.

объемом 750 мл с 50 мл среды Ридер. pH среды поддерживали на уровне значений 4,5—6,0 внесением стерильного раствора 10%-ного KOH («Химмед»). Время культивирования составляло 6 сут.

Культивирование отобранного рекомбинантного штамма *Y. lipolytica* № 20 проводили в ферментере АНКУМ-2М (Россия) объемом 10 л (исходный объем среды 5,0 л). Температуру поддерживали автоматически (29,0±0,1)°С, так же, как концентрацию растворенного в среде кислорода (20—25% от насыщения в период роста и 50—55% в период кислотообразования); pH среды (4,5 в период роста и 6,0 в период кислотообразования) регулировали добавлением 20%-ного раствора KOH. Среда для культивирования являлась модифицированным вариантом среды Ридер и имела следующий состав: (NH₄)₂SO₄ — 3,0 г/л;

MgSO₄·7H₂O — 1,4 г/л; Ca(NO₃)₂ — 0,8 г/л; NaCl — 0,5 г/л; KH₂PO₄ — 2,0 г/л; K₂HPO₄ — 0,2 г/л; двукратный раствор микроэлементов по Буркгольдеру; тиамин — 1,2 мкг/л, Fe²⁺ — 1,2 мг/л (Sigma). Рапсовое масло исходно вносили до конечной концентрации 20 г/л и далее до той же концентрации в момент повышения pO₂ на 5—10% в сравнении со стабильным уровнем насыщения кислородом (такое повышение указывало на полное потребление субстрата). Общая продолжительность культивирования составляла 6 сут.

Анализ продуктов культивирования. Рост дрожжей контролировали по сухой биомассе, которую определяли после фильтрования КЖ через мембранные фильтры (Synpro N 3, Чехословакия) с последующим высушиванием фильтров до постоянной массы.

Для анализа органических кислот использовали метод ОФ-ВЭЖХ. С этой целью отбирали 1 мл КЖ, центрифугировали 5 мин при 1500 g, отбирали 0,5 мл надосадочной жидкости и добавляли 0,5 мл 6%-ной HClO_4 для осаждения белков. Затем пробу центрифугировали в пробирках Эппендорфа (5 мин при 15000 g) и подвергали ОФ-ВЭЖХ. Элюцию осуществляли при следующих условиях: скорость 1 мл/мин; температура 35°, элюент — 20 мМ фосфорная кислота. В работе использовали ВЭЖХ-хроматограф фирмы LKB (Швеция) и колонку фирмы «Элсико» (Россия) с обращенной фазой Inertsil ODS-3 (250×4 мм). Определение кислот проводили при длине волны 210 нм. Органические кислоты идентифицировали с соответствующими стандартами («Реахим», Россия, и Sigma, США).

Все использованные в работе реактивы отечественного производства имели квалификацию «ос. ч» или «х. ч.».

В статье приведены результаты опытов, которые повторяли не менее трех-четырех раз; в каждой точке проводили два-три параллельных измерения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантных штаммов с дополнительными копиями гена *ACO1*, кодирующего аконитазу

Делеция гена *URA3* *Y. lipolytica* 672. Первоначально у штамма *Y. lipolytica* 672 была осуществлена делеция гена *URA3* размером 2868 п.н. (от -544 п.н. от стартового кодона ATG до +1469 п.н. от стоп-кодона) согласно методу [16]. Полученный штамм *Y. lipolytica* 672 ($\Delta ura3$) рос на минимальной среде YNB с глюкозой только в случае добавления в нее урацила (40 мкг/мл).

Включение дополнительных копий гена *ACO1* в геном штамма *Y. lipolytica* 672 ($\Delta ura3$). Для множественной интеграции данного гена в геном дрожжей была сконструирована плаزمиды pZ-*ACO1* (рис. 1). Эта плаزمиды включала часть стандартного вектора pUC19, ген *ACO1* с нативными участками промотора и терминатора, *zeta*-элементы для негомологичной интеграции и маркер *URA3* без промотора (*ura3d*). Селективный маркер был ограничен с двух сторон сайтами узнавания (lox66 и lox71) рекомбиназы Cre фага P1 [17]. Все вышеуказанные фрагменты синтезировали методом ПЦР, используя праймеры и последовательности ДНК, приведенные в табл. 1.

После очистки синтезированных ПЦР-фрагментов из агарозного геля проводили сборку плазмиды методом Гибсона [18] согласно протоколу производителя (New England Biolabs, Англия). Реакционную смесь использовали далее для трансформации штамма *E. coli* XL-1. Правильность сборки фрагментов подтверждали путем секвенирования полученной плазмиды (за исключением участка плазмиды pUC19). В результате этого анализа выявлено полное сходство нуклеотидной последовательности гена *ACO1* и гомологичного гена из *Y. lipolytica* E150.

Перед трансформацией дрожжевого штамма плазмиды pZ-*ACO1* была обработана эндонуклеазой *NotI* и наибольший из составляющих ее фрагментов был очищен из геля. Выделенным фрагментом методом электропорации трансформировали штамм *Y. lipolytica* 672 ($\Delta ura3$), несущий нативный ген *ACO1*, и затем трансформанты с множественными вставками *ACO1*-содержащего фрагмента отбирали при росте на среде YNB с глюкозой (1%) [19].

Присутствие дополнительных копий гена *ACO1* у штамма № 20 (см. ниже) было показано с помощью ПЦР. Для этого хромосомную ДНК выделяли, используя промытые кислотой стеклянные шарики [20], и часть интегрированного фрагмента амплифицировали с помощью пары праймеров: *ACO1*conf-F — 5'-GAGACAGTTTCCTCGG-CACCAGC-3' и *ACO1*conf-R — 5'-AGGATGAGG-ACCACTAATACTACACCCCTCAAC-3', которые «отжигались» на участке гена *URA3* и гена *ACO1*

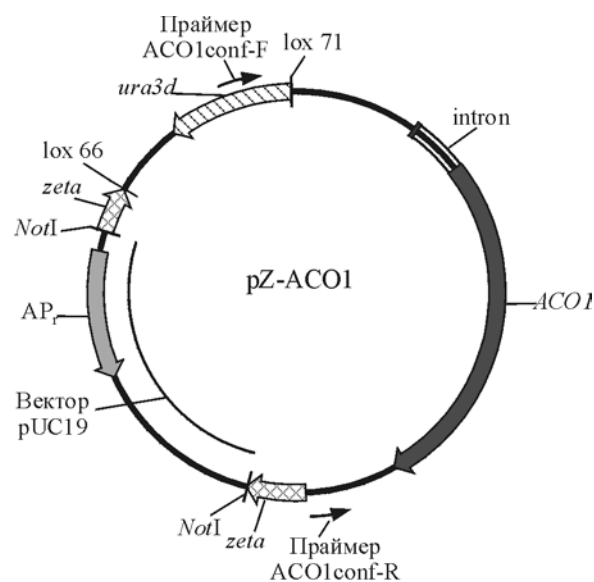


Рис.1. Структура плазмиды pZ-*ACO1*, сконструированной для повышения экспрессии гена *ACO1*

(см. рис. 1). В результате был получен фрагмент размером 4,6 т.п.н.; при использовании же в контрольной реакции хромосомной ДНК из штамма предшественника *Y. lipolytica* 672 ($\Delta ura3$), продукт не образовывался (рис. 2)

Данные по электрофорезу генома рекомбинантного варианта дрожжей № 20 после трансформации указанной плазмидой представлены на рис. 2.

Согласно данным [21], дефектный *URA3*-маркер (*ura3d4*), содержащий только +8 п.н. от стартового кодона ATG в количестве не менее 3 копий, способен компенсировать ауксотрофность штамма *Y. lipolytica* 672 ($\Delta ura3$) по урацилу. И хотя в данной работе был использован ген *URA3* без нативной последовательности выше стартового кодона (*ura3d*), тем не менее, было получено более 50 трансформантов на 1 мкг ДНК.

Анализ способности к кислотообразованию у полученных мутантов. Для оценки кислотообразующей активности рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* проводили культивирование 20 отобранных вариантов в жидкой среде Ридера с рапсовым маслом в условиях дефицита азота. По истечении 6 сут определяли содержание ЛК, ИЛК и ряда других кислот. Данные о накоплении кислот у мутантов в сравнении с исходным штаммом *Y. lipolytica* 672 представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, 11 из 20 вариантов обладали способностью к более активному биосинтезу ИЛК в сравнении с природным штаммом *Y. li-*

polytica 672. Наибольший сдвиг соотношения цитрат—изоцитрат в сторону ИЛК отмечен у штаммов № 9, 10, 12, 19 и 20. Максимальное количество ИЛК и максимальный выход ИЛК ($Y_{\text{ИЛК}}$) были отмечены у рекомбинантного штамма № 20.

Этот штамм был использован для изучения продукции им кислот в условиях ферментера. Культивирование проводили в 10-литровом ферментере с объемом среды 5 л в сбалансированной питательной среде с увеличенным содержанием железа, а также при дробном внесении рапсового

Таблица 2

Характеристика кислотообразования у рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* — продуцентов ИЛК

№ варианта	Содержание кислот, г/л		$Y_{\text{ИЛК}}, \%$	ИЛК/ЛК
	ИЛК	ЛК		
<i>Y. lipolytica</i> 672	5,10	4,70	37,0	1,10
1	1,87	1,70	9,3	1,10
2	2,08	1,56	10,4	1,33
3	1,97	1,67	9,9	1,18
4	2,00	1,18	10,0	1,70
5	1,55	1,15	7,8	1,34
6	2,10	1,59	10,5	1,32
7	1,98	1,14	9,9	1,74
8	1,97	1,70	9,3	1,15
9	11,48	5,75	57,4	2,00
10	11,56	6,37	57,8	1,82
11	4,92	3,04	24,6	1,62
12	11,78	5,97	58,9	1,97
13	12,26	7,02	61,3	1,75
14	9,67	6,19	48,3	1,56
15	13,19	7,39	65,9	1,79
16	12,76	7,44	63,8	1,72
17	12,00	6,72	60,0	1,79
18	9,00	6,00	48,1	1,50
19	11,5	6,40	59,0	1,80
20	15,23	6,42	76,1	2,37

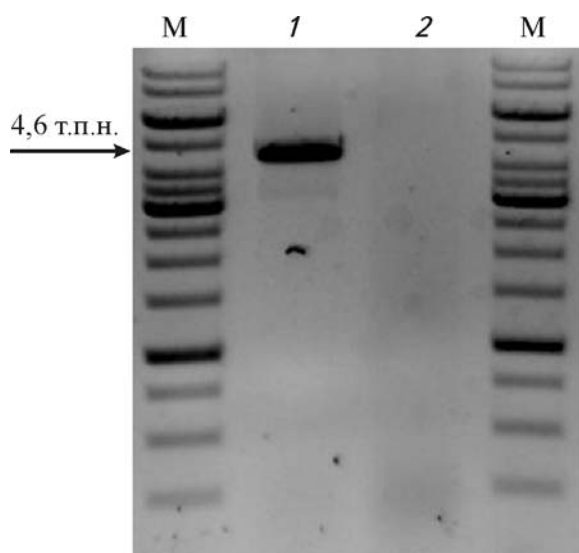


Рис. 2. Электрофореграмма результатов анализа интеграции фрагмента, содержащего ген *ACO1*: дорожка М — маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific 1 kb, США); дорожка 1 — штамм № 20; дорожка 2 — контрольный штамм *Y. lipolytica* 672 ($\Delta ura3$)

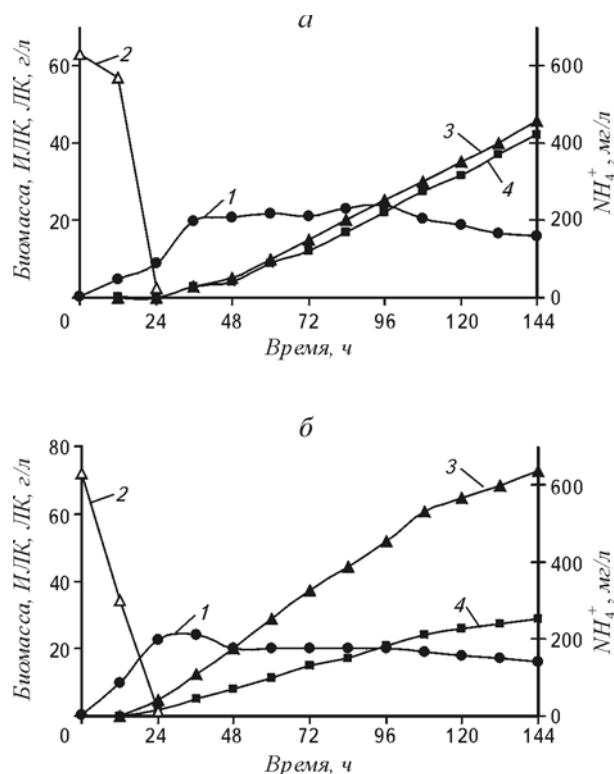


Рис. 3. Динамика биосинтеза ИЛК при культивировании исходного штамма *Y. lipolytica* 672 (а) и мутанта № 20 (б): 1 — биомасса; 2 — NH_4^+ ; 3 — ИЛК; 4 — ЛК

масла до концентрации 20 г/л, как было описано ранее [9]. В качестве контрольного использовали процесс культивирования природного штамма *Y. lipolytica* 672. Динамика синтеза ИЛК и ЛК у обоих штаммов представлена на рис. 3.

Как видно из рис. 3, сумма ИЛК и ЛК была практически одинаковой как у природного, так и у мутантного штамма, однако у рекомбинантного штамма № 20 существенно изменялось соотношение ИЛК и ЛК. Уже на 2-е сутки культивирования соотношение изоцитрат—цитрат у мутанта составляло 3:1 (см. рис. 3, б) (у природного штамма *Y. lipolytica* 672 — 1,1:1). При культивировании штамма № 20 в течение 6 сут происходило накопление 72,6 г/л ИЛК и 29,0 г/л ЛК. Для сравнения, в сходной среде с парафинами и при тех же условиях природный штамм дрожжей синтезировал 60 г/л ИЛК [1], а в среде с этиловым спиртом — 66 г/л [5]. В работе [2] наблюдали продукцию ИЛК на уровне 93 г/л, однако процесс в этом случае был более длительным (18 сут) и содержание ЛК было значительно выше (82,3 г/л), что затрудняло процесс выделения конечного продукта. В статье [13] было описано получение рекомбинантного штамма *Y. lipolytica* с повышенной экспрессией аконитат-гидратазы, который также накапливал преимущест-

венно ИЛК (до 70% от суммы кислот), однако в абсолютном выражении продукция ИЛК у данного штамма была ниже, чем у варианта № 20 в данной работе.

Более высоких результатов по уровню синтеза ИЛК и отношению ее содержания к содержанию ЛК ранее удалось достичь только с помощью мутанта *Y. lipolytica* УФ/НГ, который был получен при комбинированном воздействии ультрафиолетовых лучей (4 мин) и *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидина (50 мкг/мл) на клетки *Y. lipolytica* 704. Этот мутант характеризовался ослабленным ростом на среде с ацетатом. В 500-литровом ферментере на среде с рапсовым маслом при ингибировании 30 мМ итаконовой кислотой данный вариант накапливал 88,7 г/л ИЛК и 15,1 г/л ЛК (при соотношении ИЛК—ЛК, соответственно равном 6:1) [11].

Таким образом, в данной работе установлена возможность направленного синтеза ИЛК из рапсового масла с применением рекомбинантного штамма *Y. lipolytica* № 20 с повышенной экспрессией аконитат-гидратазы, у которого соотношение изоцитрат—цитрат достигало 2,5:1, в то время как у штаммов дикого типа *Y. lipolytica* 672 оно составляло 1,1:1. Дальнейшая работа будет направлена на оптимизацию состава питательной среды и условий культивирования, что позволит создать высокоэффективный процесс биосинтеза ИЛК с использованием штамма, полученного в данной работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62514-X0005) с использованием уникальной научной установки (УНУ) — Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (уникальный идентификатор проекта RFMEFI59214X0002).

Получено 23.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Финогенова Т.В. Перспективы производства органических кислот дрожжами *Yarrowia lipolytica* / Т.В. Финогенова, И.Г. Моргунов, С.В. Камзолова, О.Г. Чернявская // Прикл. биохим. микробиол. — 2005. — Т. 41(5) — С. 478—486.
2. Heretsch, P. Syntheses with a chiral building block from the citric acid cycle: (2R,3S)-isocitric acid by fermentation of sunflower oil / P. Heretsch, F. Thomas, A. Aurich, H. Krautscheid, D. Sicker, A. Giannis // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. — 2008. — V. 47 (10). — P. 1958—1960.
3. Aurich, A., Specht, R., Møller, R.A., Stottmeister, U., Yovkova, V., Otto, Ch., Holz, M., Barth, G., Heretsch, Ph., Thomas, F.A., Sicker, D., Giannis, A. Microbiologically produced carboxylic

- acids used as building blocks in organic synthesis: Reprogramming Microbial Metabolic Pathways. [Eds. X. Wang, J. Chen, P. Quinn]. V.64. — London: Springer, 2012. — P. 391—423.
4. Groenewald, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential / M. Groenewald, T. Boekhout, C. Neuveglise, C. Gaillardin, P.W. van Dijk, M. Wyss // Crit. Rev. Microbiol. — 2014. — V. 40 (3). — P. 187—206.
 5. Finogenova, T.V. Biosynthesis of isocitric acid from ethanol by yeast / T.V. Finogenova, N.V. Shishkanova, E.A. Fausek, S.S. Eremina // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1991. — V. 36. — P. 231—235.
 6. Камзолова С.В. Особенности роста на рапсовом масле и синтеза лимонной и изолимонной кислот у дрожжей *Yarrowia lipolytica* / С.В. Камзолова, Т.В. Финогенова, Ю.Н. Лунина, О.А. Перевозникова, Л.Н. Миначова, И.Г. Моргунов // Микробиология. — 2007. — Т. 76 (1). — С. 26—31.
 7. Kamzolova, S.V. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat / S.V. Kamzolova, I.G. Morgunov, A. Aurich, O.A. Perevznikova, N.V. Shishkanova, U. Stottmeister, T.V. Finogenova // Food Technol. Biotechnol. — 2005. — V. 43 (2). — P. 113—122.
 8. Kamzolova, S.V. Microbiological production of citric and isocitric acids from sunflower oil / S.V. Kamzolova, T.V. Finogenova, I.G. Morgunov // Food Technol. Biotechnol. — 2008. — V. 46 (1). — P. 51—59.
 9. Kamzolova, S.V. Isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast / S.V. Kamzolova, E.G. Dedyukhina, V.A. Samoilenko, J.N. Lunina, I.F. Puntus, R.K. Allayarov, M.N. Chiglintseva, A.A. Mironov, I.G. Morgunov // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — V. 97 (20). — P. 9133—9144.
 10. Kamzolova, S.V. Inhibition of isocitrate lyase shifts metabolism toward the isocitrate overproduction in yeast *Yarrowia lipolytica* / S.V. Kamzolova, I.G. Morgunov // J. Biomol. Struct. Dynam. — 2015. — V. 33 (1). — P. 107—108.
 11. Камзолова С.В. Биосинтез изолимонной кислоты дрожжами *Yarrowia lipolytica* и его регуляция / С.В. Камзолова, Ю.Н. Лунина, Р.К. Аллаяров, И.Ф. Пунтус, И.А. Лаптев, В.А. Самойленко, И.Г. Моргунов // Прикл. биохим. микробиол. — 2015. — Т. 51(2). — С. 251—257.
 12. Förster, A. Overexpression of the ICL1 gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica* / A. Förster, K. Jacobs, T. Juretzek, S. Mauersberger, G. Barth // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 77 (4). — P. 861—869.
 13. Holz, M. Aconitase overexpression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica* / M. Holz, A. Förster, S. Mauersberger, G. Barth // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — V. 81 (6). — P. 1087—1096.
 14. Molecular cloning: a laboratory manual [Eds. J. Sambrook, T. Maniatis, E.F. Fritsch]. — New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
 15. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — V. 227 (5259). — P. 680—685.
 16. Scherer, S. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro* / S. Scherer, R.W. Davis // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. — 1979. — V.76 (10). — P. 4951—4955.
 17. Albert, H. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome / H. Albert, E.C. Dale, E. Lee, D.W. Ow // Plant J. — 1995. — V. 7 (4). — P. 649—659.
 18. Gibson, D.G. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases / D.G. Gibson, L. Young, R.Y. Chuang, J.C. Venter, C.A. Hutchison, H.O. Smith // Nature Methods. — 2009. — V. 6(5). — P. 343—345.
 19. Wang, J.H. High efficiency transformation by electroporation of *Yarrowia lipolytica* / J.H. Wang, W. Hung, S.H. Tsai // J. Microbiol. — 2011. — V. 49 (3). — P. 469—472.
 20. Hoffman, C.S. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli* / C.S. Hoffman, F. Winston // Gene. — 1987. — V. 57 (2—3). — P. 267—272.
 21. Juretzek, T. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica* / T. Juretzek, M. Le Dall, S. Mauersberger, C. Gaillardin, G. Barth, J. Nicaud // Yeast. — 2001. — V. 18(2). — P. 97—113.
- I.A. LAPTEV^{1,*}, N.A. FILIMONOVA¹, R.K. ALLAYAROV², S.V. KAMZOLOVA², V.A. SAMOILENKO², S.P. SINEOKY¹, and I.G. MORGUNOV²
- ¹The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia
- ²The Skryabin Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms (IBFM), Russ. Acad. Sci., 142290, Moskovskaya oblast, Pushchino Russia
- e-mail: ivanlaptev@mail.ru

New Recombinant Strains of *Yarrowia lipolytica* Yeast with Overexpression of Aconitate Hydratase Gene to Obtain Isocitric Acid

The *Yarrowia lipolytica* yeast are capable of high-intense synthesis (*supersynthesis*) of citric and isocitric acids at the nitrogen limitation. The ratio of the synthesized acids depends on used producing strains and levels of the expression of a gene for aconitate hydratase. Recombinant variants with the overexpression of the multicopy *ACO1* gene for aconitate hydratase were obtained on the basis of the initial isocitrate-producing *Y. lipolytica* 672 strain. A recombinant strain of *Y. lipolytica* 20 in which the isocitrate—citrate ratio is shifted toward the first up to 2.3:1 (with the ratio 1.1:1 in the parental strain) was selected. The culturing of the variant 20 in a 10-l fermenter resulted in the production of 72.6 g/l of isocitric and 29.0 g/l of citric acid with their ratio 2.5:1, which permits to regard the *Y. lipolytica* 20 strain as a promising producer for the development of an industrial process for the isocitrate production.

Key words: *ACO1* gene overexpression, aconitate hydratase, isocitric acid, *Yarrowia lipolytica*.

* Author for correspondence.