

УДК 578.8

ИНДУЦИРУЕМЫЙ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИОНОВ ФОРМИАТА

© 2024 г. А. А. Черенкова^{1, 2}, Т. В. Юзбашев³, О. Е. Мелькина^{1, *}

¹“Курчатовский институт” Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий,
Москва, 123098 Россия

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва, 125480 Россия

³Plant Sciences and the Bioeconomy, Rothamsted Research, West Common, Harpenden,
AL5 2JQ, Hertfordshire, UK

*e-mail: oligamelkina@gmail.com

Поступила в редакцию 27.03.2024 г.

После доработки 16.04.2024 г.

Принята к печати 26.04.2024 г.

Сконструировано 10 штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica*, в геном которых интегрированы промоторы генов формиадегидрогеназ, расположенные перед геном-репортером *hrGFP*. Полученные штаммы могут выступать в качестве цельноклеточных биосенсоров для детекции ионов формиата в различных средах. На основании визуальной оценки флуоресценции биомассы было отобрано 3 наиболее перспективных варианта. Проведено измерение основных характеристик (пороговая чувствительность, амплитуда и время ответа) выбранных штаммов. В результате штамм В26 был признан наиболее подходящим по характеристикам для детекции ионов формиата. Для питательной среды подобран источник углерода, не снижающий активацию биосенсора. Показано, что в отличие от ионов формиата и формальдегида, метанол практически не активирует флуоресценцию биосенсора.

Ключевые слова: индуцируемый промотор, флуоресценция, формиат-ион, цельноклеточный биосенсор, *Yarrowia lipolytica*

DOI: 10.31857/S0555109924050128 EDN: QSTNOY

Муравьиная кислота (формиат-ион, HCOO^-) является простейшим карбоксильным соединением, метаболитом растений, насекомых и микроорганизмов. Она используется в качестве консерванта в кормах и пищевых продуктах, подкислителя в текстильной и кожевенной промышленности, реагента в химических производствах и в современных топливных элементах (<https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive.html?archive=All>) [1, 2]. Формиат образуется как побочный продукт в ряде технологических процессов; например, при ферментативной обработке лигноцеллюлозного сырья он ингибирует последующий гидролиз или процесс ферментации [3, 4]. Формиат натрия добавляют в антигололедные реагенты для снижения их коррозионной активности, что может привести к накоплению химических реагентов в глубинных слоях почвы придорожной полосы [5]. Также муравьиная кислота может служить индикатором интоксикации организма формальдегидом, метанолом или ацетоном [6]. Все это подчеркивает необходимость определения формиат-иона в различных средах и субстанциях.

Для детекции формиат-иона используют высокоэффективную жидкостную и газовую хроматографии. Однако данные методы обладают невысокой селективностью, их применение иногда затруднено сложной пробоподготовкой, потребностью в маломобильном дорогостоящем оборудовании и высококвалифицированном персонале [7–10]. Одна из альтернатив хроматографическим методам детекции – применение биосенсоров. Цельноклеточные индуцируемые биосенсоры – это клетки микроорганизмов с встроенными в геном двумя основными элементами: регуляторной системой (промоторно-операторная область) и транскрипционно-слитыми с ней генами-репортерами. В качестве генов-репортеров чаще всего используют *lacZ* (кодирует б-галактозидазу), *gfp* (кодирует зеленый флуоресцентный белок) и *luxCDABE* (кодируют люциферазу и редуктазу) [11, 12]. В норме (при отсутствии в среде индуктора) промотор перед генами-репортерами закрыт, и клетки биосенсора не отличаются от контрольного штамма. При появлении в среде индуктора происходит активация промотора с последующим синтезом белка-репортера.

В этом случае клетки биосенсора начинают флуоресцировать, люминесцировать и т.д.

Гены формиадегидрогеназ (КФ:1.2.2.1, 1.17.1.9, 1.17.1.10, 1.17.2.3, 1.17.5.3, 1.17.98.3, 1.17.98.4) обнаружены во многих метилотрофных и немилотрофных микроорганизмах: *Methylobacterium extorquens* [13], *Pseudomonas aeruginosa* [14], *Escherichia coli* [15], *Candida boidinii* [16], *Hansenula polymorpha* [17], *Saccharomyces cerevisiae* [18] и др. [19]. В немилотрофных дрожжах *Yarrowia lipolytica* идентифицировано 10 генов формиадегидрогеназ и соответствующих им 10 промоторных последовательностей [20]. На основе их регуляторных областей возможно конструирование специфических биосенсоров разной степени чувствительности.

Цель настоящей работы – создание индуцируемых, специфических биосенсоров (с геном-репортером *hrGFP*) для детекции ионов формиа.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов и плазмиды. Для наработки плазмидной ДНК использовали штамм *Escherichia coli* TOP10 F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1* λ^- [21].*

В работе использовали штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica* Y-3178 W29 MatA (дикий тип) и Y-4973 W29 Δ *ku70* Δ *URA3* – оба получены из БРЦ ВКПМ.

Плазмидный вектор pProUA-mScarlet содержит ген устойчивости к ампициллину (Ap^r), ген зеленого флуоресцентного белка (*hrGFP*), который оптимизирован по кодонам для экспрессии в *Y. lipolytica*, а также селективный маркер для дрожжей *URA3* (ген синтеза урацила). Хелперная плазида pCasNA-IntC2 содержит ген белка Cas9, последовательность ДНК-мишени (sgRNA), гены устойчивости к ноурсетрицину (Nat^r) и ампициллину (Ap^r) [22].

Конструирование биосенсорных штаммов *Y. lipolytica*. Гены формиадегидрогеназ в геноме *Y. lipolytica* были идентифицированы по гомологии аминокислотных последовательностей с формиадегидрогеназой FDH1 *S. cerevisiae* (КФ:1.17.1.9) с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, США). Согласно базе данных GenBank (NCBI, США) гены формиадегидрогеназ в геноме *Y. lipolytica* расположены в следующих локусах: YALI1_A12502g, YALI1_B26033g, YALI1_B29419g, YALI1_C10762g, YALI1_C20054g, YALI1_F18740g, YALI1_F21426g, YALI1_F36552g, YALI1_E17326g, YALI1_E19014g.

Штаммы *Y. lipolytica* для тестирования промоторов были сконструированы согласно мануалу *YaliCraft* с использованием Pro Module [22]. Для этого нуклеотидные последовательности длиной 800 п.н., расположенные перед генами

формиадегидрогеназ (*FDH*) дрожжей *Y. lipolytica*, были химически синтезированы компанией “Twist Bioscience” (США) и встроены в предоставленный компанией вектор pProUA-mScarlet непосредственно перед геном-репортером *hrGFP*. Полученные от “Twist Bioscience” плазмиды pProUA-pFDH_A1, pProUA-pFDH_B26, pProUA-pFDH_B29, pProUA-pFDH_C1, pProUA-pFDH_C2, pProUA-pFDH_F1, pProUA-pFDH_F2, pProUA-pFDH_F3, pProUA-pFDH_E17, pProUA-pFDH_E19 трансформировали в клетки *E. coli* TOP10 для наработки плазмидной ДНК. Трансформацию клеток и выделение плазмидной ДНК проводили согласно [21].

Наработанные плазмиды линеаризовали по сайтам рестрикции NotI и встраивали в хромосому С штамма Y-4973 *Y. lipolytica*. Трансформацию дрожжей проводили совместно с хелперной плазмидой pCasNA-IntC2 по ранее описанному протоколу [22]. Верификацию трансформантов проводили методом ПЦР. Сконструированные штаммы биосенсоров приведены в табл. 1.

Питательные среды и условия роста. Клетки *E. coli* TOP10 выращивали в бульоне Лурия–Бертани (LB) при 37°C в течение 2 ч до середины экспоненциальной фазы роста. Селекцию трансформированных штаммов TOP10 проводили на L-агаре с добавлением ампициллина (100 мкг/мл).

Для трансформации клетки *Y. lipolytica* Y-4973 выращивали при 30°C в течение 16–20 ч до экспоненциальной фазы роста на агаризованной среде YP (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л) с добавлением глюкозы (1 об. %) в качестве источника углерода. Отбор трансформированных штаммов дрожжей проводили на агаризованной среде YNB (Yeast Nitrogen Base; M139, “HIMEDIA”, Индия, 6.75 г/л) с глюкозой (1 об. %) и ноурсетрицином (50 мкг/мл). Для дальнейших экспериментов штаммы *Y. lipolytica* выращивали на агаризованной или в жидкой среде YNB с добавлением источника углерода до требуемой концентрации.

Ферменты и химические вещества. Все химические препараты были аналитической чистоты. Ферменты для работы с ДНК получены от “Fermentas” (Литва). В качестве индукторов использовали формиа натрия, формальдегид и метанол фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Все тест-растворы готовили непосредственно перед их использованием.

Измерение и визуальная оценка флуоресценции биосенсоров. Для визуальной оценки флуоресценции сконструированных биосенсоров ночную культуру дрожжевых штаммов разводили в стерильном физиологическом растворе до оптической плотности 0.8, после чего высевали по 5 мкл клеточных суспензий на чашки Петри с агаризованной YNB, содержащей 1% глюкозы и различные концентрации формиа натрия. Чашки инкубировали при 30°C в течение 24 ч. Активность биосенсоров оценивали по интенсивности зеленой флуоресценции

Таблица 1. Описание генотипов сконструированных штаммов биосенсоров

Промотор (локус гена <i>FDH</i>)	Плазмида для интеграции	Штамм <i>Y. lipolytica</i>	Обозначение штамма
YALI1_A12502g	pProUA-pFDH_A1	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_A1} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	A1
YALI1_B26033g	pProUA-pFDH_B26	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_B26} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	B26
YALI1_B29419g	pProUA-pFDH_B29	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_B29} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	B29
YALI1_C10762g	pProUA-pFDH_C1	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_C1} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	C1
YALI1_C20054g	pProUA-pFDH_C2	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_C2} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	C2
YALI1_F18740g	pProUA-pFDH_F1	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_F1} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	F1
YALI1_F21426g	pProUA-pFDH_F2	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_F2} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	F2
YALI1_F36552g	pProUA-pFDH_F3	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_F3} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	F3
YALI1_E17326g	pProUA-pFDH_E17	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_E17} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	E17
YALI1_E19014g	pProUA-pFDH_E19	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_E19} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2}	E19

выросшей биомассы, просматривая чашки в синем светодиодном трансиллюминаторе DR46B “Clare Chemical Research” (США) с оранжевым фильтром.

Для измерения временной зависимости интенсивности флуоресценции биосенсоров от различных концентраций индуктора дрожжевые штаммы рассеивали на агаризованной YNB с 1 об./об. % глюкозы и выращивали при 30°C в течение 20 ч. Выросшую биомассу клеток разводили в жидкой YNB, содержащей необходимые концентрации источника углерода и индуктора, до оптической плотности 0.3. Контрольные пробы готовили аналогично, но без добавления индуктора. По 100 мкл приготовленных проб переносили в лунки планшета 655096 “Greiner Bio-One” (Германия), который затем помещали в мультимодальный ридер CLARIOstar Plus (“BMG Labtech”, Германия) и инкубировали при 30°C и 500 об./мин в течение 6 ч с измерением оптической плотности и флуоресценции каждые 15 мин согласно [22]. Относительную флуоресценцию для каждой лунки рассчитывали путем деления измеренных значений флуоресценции на значения оптической плотности (FLU/OD₆₀₀). Количество повторов составляло 5 лунок для каждой концентрации формиата натрия. Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения MARS (“BMG Labtech”, Германия) и Excel (“Microsoft”, США).

На основании полученных данных были определены три основных параметра, характеризующих качество биосенсора: амплитуда ответа (АО), минимальное время ответа (*t_m*) и пороговая чувствительность. АО определяется по формуле: $AO = I_t - I_o / I_k - I_o$, где *I_o* – относительная

флуоресценция препарата в момент добавления индуктора (*t* = 0); *I_k* – относительная флуоресценция контрольного препарата в момент *t*; *I_t* – относительная флуоресценция опытного препарата в момент *t*. Минимальное время ответа *t_m* определяется интервалом времени между моментом добавления индуктора и моментом фиксации люминометром достоверного усиления сигнала по сравнению с (*I_k*–*I_o*). Пороговая чувствительность определяется минимальной концентрацией индуктора, при которой АО равна примерно 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Качественная оценка флуоресценции сконструированных штаммов. На первом этапе активность сконструированных биосенсоров (табл. 1) оценивали качественно: по интенсивности зеленой флуоресценции биомассы штаммов, выращенных на агаризованной среде, содержащей 0 (контроль) и 10 мМ формиата натрия (рис. 1). Видно, что большая часть тестируемых штаммов не флуоресцирует, как и дикий штамм Y-3178 (wt), даже в присутствии формиата (рис. 1 б). Выраженное зеленое свечение демонстрируют 3 варианта штамма – A1, B26 и B29.

На основании качественной оценки штаммы A1, B26 и B29 были отобраны в качестве возможных биосенсоров для количественного измерения флуоресценции и сравнения их характеристик.

Количественная оценка флуоресценции штаммов A1, B26 и B29. На рис. 2 приведены кривые зависимости нормализованной по оптической плотности (OD) флуоресценции штаммов A1, B26 и B29 от времени инкубации в среде, содержащей

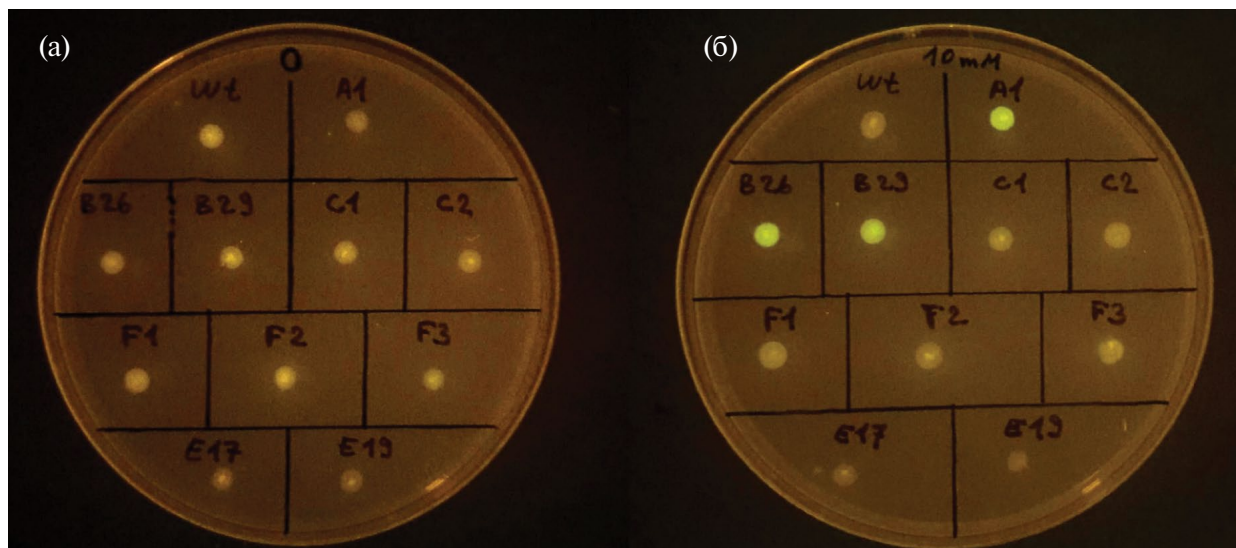


Рис. 1. Флуоресценция (hrGFP) биомассы штаммов дрожжей после выращивания в течение 20 ч на агаризованной среде YNB с 1% глюкозы без формиата (а) и с добавлением 10 мМ формиата натрия (б). Контрольный штамм Y-3178 W29 MatA (дикий тип) обозначен как wt.

различные концентрации формиата натрия. Дрожжевые штаммы рассеивали на агаризованной YNB с 1% глюкозы и выращивали при 30°C в течение 20 ч. Выросшую биомассу клеток разводили в жидкой YNB с 1% глюкозы до оптической плотности 0.3. Далее по 100 мкл клеточной суспензии переносили в лунки планшета 655096 “Greiner Bio-One” (Германия) и добавляли формиат натрия в заданных концентрациях в качестве индуктора. Затем планшет помещали в мультимодальный ридер CLARIOstar Plus (“BMG Labtech”, Германия) и инкубировали при 30°C и 500 об./мин в течение 6 ч с измерением оптической плотности и флуоресценции каждые 15 мин согласно [22].

Как видим, все три штамма (A1, B26 и B29) отвечали усилением флуоресценции при добавлении формиата натрия. Время ответа совпадало для всех трех штаммов и составляло 60–70 мин. Однако среди тестируемых штаммов наиболее низкую пороговую концентрацию в 10 мкМ показывал B26 (рис. 2б), в то время как пороговая концентрация для A1 составляла 100 мкМ (рис. 2а), а для B29 – 1 мМ (рис. 2в). Необходимо отметить более высокий фон флуоресценции у штамма B29 по сравнению с A1 и B26, что приводило к снижению амплитуды ответа. Таким образом, оптимальным штаммом для определения содержания в среде формиат-ионов являлся B26.

На рис. 3 приведены зависимости максимальной отдачи (АО) штаммов A1, B26 и B29 от различных концентраций формиата натрия. Согласно приведенному графику штамм B26 показывал наибольшую АО по всем проверенным концентрациям формиата натрия, поэтому штамм B26 был выбран

в качестве цельноклеточного биосенсора для детекции ионов формиата.

Подбор оптимального источника углерода. В предыдущих работах показано, что добавление глюкозы в качестве источника углерода может снижать индукцию промоторов генов формиатдегидрогеназ [23, 24]. В питательную среду в качестве источников углерода добавляли глюкозу (1%), сорбит (1.5%), маннит (1%) или цитрат (1%) и сравнивали уровень открытия промотора в штамме B26 при добавлении 10 мМ формиата. Результат эксперимента приведен на рис. 4.

Хуже всего на активацию биосенсора повлияло добавление в питательную среду цитрата. Добавление сорбита или маннита показало одинаковый уровень открытия промотора, при этом АО биосенсора в среде с маннитом или сорбитом действительно оказалась выше, чем в среде с глюкозой. В результате, в качестве источника углерода для питательной среды был выбран маннит, поскольку *Y. lipolytica* утилизировала его лучше сорбита.

Измерение основных характеристик и проверка специфичности биосенсора B26. Известно, что формиатдегидрогеназы дрожжей (как метилотрофных, так и неметилотрофных) участвуют в процессе окисления формальдегида до углекислого газа [18]. Формальдегид, который образуется при окислении метанола или в других клеточных процессах, цитотоксичен, поэтому все организмы имеют пути детоксикации формальдегида [25]. Несмотря на то, что *Y. lipolytica* не относится метилотрофным дрожжам, была проведена проверка возможной активации биосенсора B26 не только формальдегидом, но и метанолом.

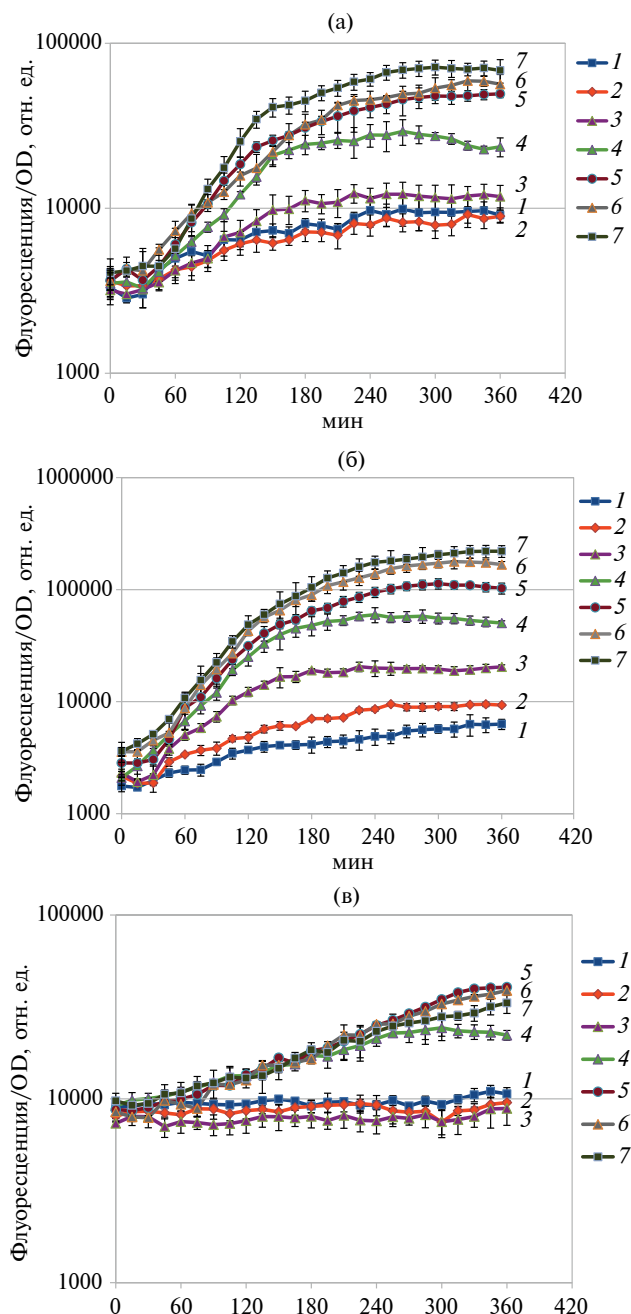


Рис. 2. Зависимость нормализованной по оптической плотности (OD) флуоресценции штаммов A1 (а), B26 (б) и B29 (в) от времени инкубации в среде с формиатом натрия: 1 – без формиата натрия, 2 – 10 μ M, 3 – 100 μ M, 4 – 1 mM, 5 – 10 mM, 6 – 90 mM, 7 – 440 mM.

На рис. 5 приведены кривые зависимости нормализованной по оптической плотности (OD) флуоресценции биосенсора B26 от времени инкубации в среде YNB с 1% маннита и различными концентрациями формиата натрия, формальдегида или метанола. Диапазон нормализованной флуоресценции клеток биосенсора при добавлении формиата натрия колебался от 10000 до

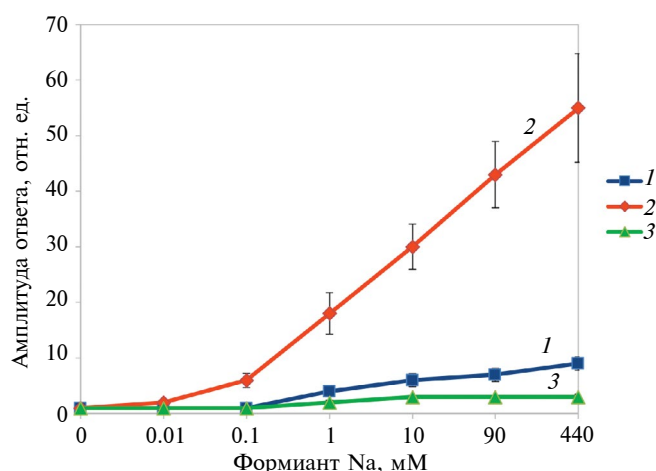


Рис. 3. Зависимость максимального ответа (АО) штаммов A1, B26 и B29 от различных концентраций формиата натрия. 1 – A1, 2 – B26, 3 – B29.

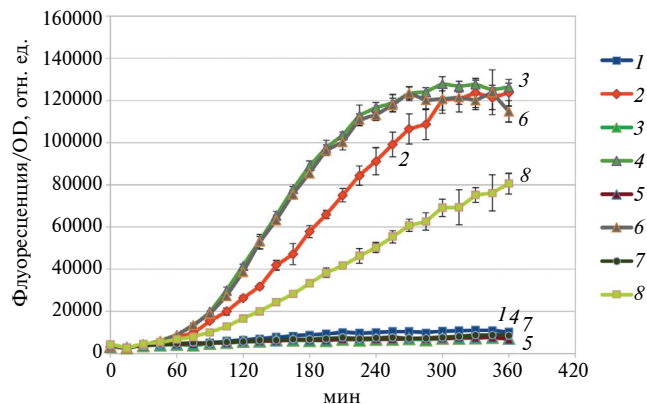


Рис. 4. Влияние источников углерода в питательной среде на активацию биосенсора B26 при добавлении 10 mM формиата: 1 – глюкоза (1%), 2 – глюкоза и формиат, 3 – сорбит (1.5%), 4 – сорбит и формиат, 5 – маннит (1%), 6 – маннит и формиат, 7 – цитрат (1%), 8 – цитрат и формиат.

200000 в зависимости от концентрации индуктора в среде (рис. 5а). Пороговая концентрация составляла 10 μ M, минимальное время ответа – 70 мин и зависело от концентрации индуктора. Следует отметить, что клетки биосенсора хорошо перенесли добавление высоких концентраций формиата натрия (до 6%).

Если в качестве индуктора использовался формальдегид (рис. 5б), то диапазон рабочих концентраций биосенсора резко сузился из-за высокой цитотоксичности индуктора. При этом, чувствительность биосенсора к формальдегиду была достаточно низкой, пороговая концентрация составляла 400 μ M. Минимальное время ответа пролонгировано относительно времени ответа биосенсора на ионы формиата и составляло 1.5 ч.

При добавлении метанола активация биосенсора практически отсутствовала. Наблюдалось

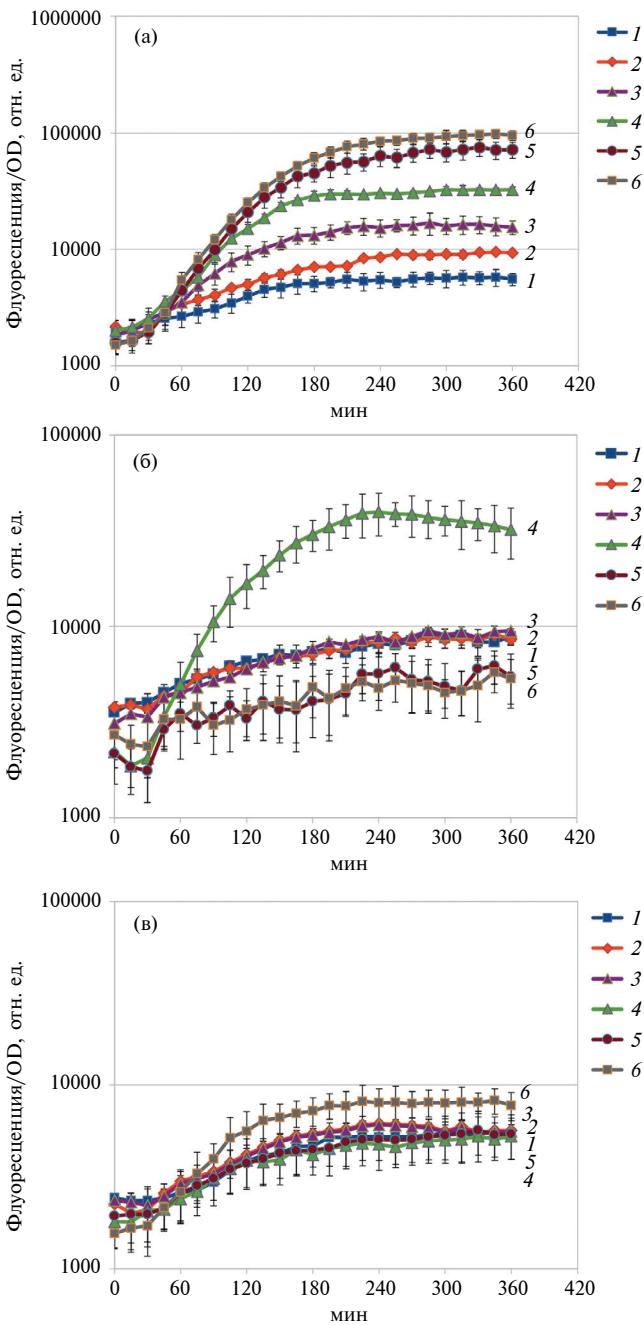


Рис. 5. Зависимость нормализованной по оптической плотности (OD) флуоресценции биосенсора B26 от времени инкубации в питательной среде, содержащей маннит (1%) и формиат натрия (а), формальдегид (б) или метанол (в) в концентрациях: 1 – без добавления, 2 – 10 мкМ, 3 – 100 мкМ, 4 – 1 мМ, 5 – 10 мМ, 6 – 100 мМ.

незначительное увеличение флуоресценции при концентрации метанола в среде 100 мМ (рис. 5в). Таким образом, применение такого биосенсора для детекции метанола не рекомендуется.

Рассчитанные значения основных параметров биосенсора B26 представлены в табл. 2.

Таблица 2. Основные характеристики биосенсора B26

Индуктор	[C]*, М	АО _{max}	t _m , мин	Пороговая чувствительность
Формиат натрия	10 ⁻⁴	6 ± 1.8	70	10 ⁻⁵ М
	10 ⁻³	18 ± 4.0		
	10 ⁻²	30 ± 6.0		
	0.1	43 ± 9.8		
Формальдегид	10 ⁻³	6 ± 1.3	90	0.4·10 ⁻³ М
Метанол	0.1	2.3 ± 0.9	120	0.1 М

*[C] – концентрация индуктора, при которой АО максимальна.

* * *

В данной работе для определения формиат-иона (НСОО⁻) в различных средах сконструирован цельноклеточный биосенсор на основе дрожжей *Y. lipolytica* с пороговой чувствительностью 10 мкМ, что сопоставимо с хроматографическими методами анализа [26]. Предложенный в работе цельноклеточный биосенсор уступал по чувствительности другому типу биосенсоров, основанных на ферментативной активности формиатдегидрогеназ, функционирующих в свободном виде [6, 27, 28] или локализованных на поверхности микробных клеток [26]. Пороговая концентрация таких биосенсоров составляет 2–5 мкМ. Однако трудоемкость выделения чистого фермента, проверка его локализации, стабильности и активности, а также сложность детекции продуктов ферментативной реакции могут препятствовать широкому применению подобных систем. Разработанный биосенсор лишен этих недостатков и может применяться в любой лаборатории, оснащенной флуориметром. При концентрации ионов формиата выше 5 мМ возможна визуальная оценка активации биосенсора при его посеве на агаризованную питательную среду.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robles H. Encyclopedia of Toxicology. 2nd Ed. / Ed. P. Wexler: Elsevier, 2005. P. 378–380.
2. Cunha S., Rangaiah G.P., Hidajat K. Computer Aided Chemical Engineering. / Eds. A. Espuña, M. Graells, L. Puigjaner: Elsevier, 2017. V. 40. P. 1093–1098.

3. Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.O. // *Enzyme Microb. Technol.* 1999. V. 24. P. 151–159.
4. Zaldivar J., Martinez A., Ingram L.O. // *Biotechnol. Bioeng.* 2000. V. 68. № 5. P. 524–530.
5. Кочетков А.В. // *Строительные материалы*. 2011. № 7. С. 44–46.
6. Triebig G., Schaller K.H. // *Clin Chim Acta*. 1980. V. 108. № 3. P. 355–360.
7. Ohmori S., Sumii I., Toyonaga Y., Nakata K., Kawase M. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 426. № 1. P. 15–24.
8. Kim, J.K., Shiraishi T., Fukusaki E.I., Kobayashi A. // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 986. № 2. P. 313–317.
9. Abolin C., McRae J.D., Tozer T.N., Takki S. // *Biochem. Med.* 1980. V. 23. № 2. P. 209–218.
10. Campos A.F., Cassella R.J. // *Food Chem.* 2018. V. 269. P. 252–257.
11. Cheng Vollmer A., Van Dyk T.K. // *Adv. Microb. Physiol.* 2004. V. 49. P. 131–174.
12. Bazhenov S.V., Novoyatlova U.S., Scheglova E.S., Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Kessenikh A.G. et al. // *Biosens. Bioelectron.* X. 2023. V. 13. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100323>.
13. Chistoserdova L., Laukel M., Portais J.C., Vorholt J.A., Lidstrom M.E. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 1. P. 22–28.
14. Godfrey C., Coddington A., Greenwood C., Thomson A.J., Gadsby P.M. // *Biochem. J.* 1987. V. 243. № 1. P. 225–233.
15. Benoit S., Abaibou H., Mandrand-Berthelot M.A. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 24. P. 6625–6634.
16. Sakai Y., Murdanoto A.P., Konishi T., Iwamatsu A., Kato N. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. № 14. P. 4480–4485.
17. Патент ЕС. 1988. № 0299108A1.
18. Overkamp K.M., Kötter P., van der Hoek R., Schoondermark-Stolk S., Luttik M.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. // *Yeast*. 2002. V. 19. № 6. P. 509–520.
19. Kobayashi A., Taketa M., Sowa K., Kano K., Higuchi Y., Ogata H. // *IUCrJ*. 2023. V. 10. P. 544–554.
20. Патент Великобритании, Германия. 2022. № WO2022008929A1.
21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир, 1984. 480 с.
22. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Melkina O.E., Patel D., Bubnov D., Dietz H., Ledesma-Amaro R. // *Commun. Biol.* 2023. V. 6. № 1. P. 858.
23. Yurimoto H., Komeda T., Lim C.R., Nakagawa T., Kondo K., Kato N., Sakai Y. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1493. P. 56–63.
24. Hartner F.S., Glieder A. // *Microb. Cell Fact.* 2006. V. 5. P. 39.
25. Chen N.H., Djoko K.Y., Veyrier F.J., McEwan A.G. // *Front Microbiol.* 2016. V. 7. P. 257.
26. Liu A., Feng R., Liang B. // *Enzyme Microb. Technol.* 2016. V. 91. P. 59–65.
27. Buttery J.E., Chamberlain B.R. // *J. Anal. Toxicol.* 1988. V. 12. № 5. P. 292–294.
28. Ogata M., Iwamoto T. // *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 1990. V. 62. № 3. P. 227–232.

Inducible Whole-Cell Biosensor for Detection of Formate Ions

A. A. Cherenkova^{a, b}, T. V. Yuzbashev^c, and O. E. Melkina^{a, *}

^aComplex of NBICS Technologies, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123098 Russia

^bMendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 125480 Russia

^cPlant Sciences and the Bioeconomy, Rothamsted Research, West Common, Harpenden, AL5 2JQ, Hertfordshire, UK

*e-mail: oligamelkina@gmail.com

Ten strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* were constructed, the genomes of which contain *hrGFP* gene under the regulation of the formate dehydrogenase promoters. The resulting strains can act as whole-cell biosensors for the detection of formate ions in various mediums. By visual assessment of biomass fluorescence, we selected the three most promising yeast strains. The main biosensor characteristics (threshold sensitivity, amplitude and response time) of the selected strains were measured. As a result, in terms of characteristics, the B26 strain was recognized as the most suitable for the detection of formate ions. A carbon source for the nutrient medium that does not reduce the activation of the biosensor was selected. Furthermore, we showed that unlike formate and formaldehyde, methanol practically does not induce the biosensor fluorescence response.

Keywords: inducible promoter, fluorescence, formate ion, whole-cell biosensor, *Yarrowia lipolytica*