

DOI: 10.7868/S3034574X26010037  
УДК 577.218

Оригинальная статья

## СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ ПРИ ПРОДУКЦИИ $\beta$ -КАРОТИНА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

А.А. Черенкова\*, М.О. Таратынова, О.Е. Мелькина

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Российская Федерация

\*E-mail: anncheren@gmail.com

**Аннотация.** При создании штаммов-продуцентов сильные конститутивные промоторы выступают заманчивой альтернативой индуцибельным промоторам, поскольку не требуют внесения в питательную среду недешевых, а иногда и токсичных индуцирующих веществ. В настоящей работе проведено сравнение конститутивных промоторов *Yarrowia lipolytica* pEXP1, pRPS2, pRPL22 (нативные) и hybRPS2\_499, hybRPL22 (синтетические) с индуцибельным промотором pEYK1-3AB. При этом синтетические промоторы hybRPS2 и hybRPL22 являются модифицированными вариантами рибосомных промоторов pRPS2 и pRPL22 соответственно. Первоначально сила промоторов оценивалась по уровню экспрессии репортерного гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок hrGFP. Показано, что сила промоторов возрастала в следующем порядке: pRPS2 < pRPL22 < pEXP1 < hybRPL22 < hybRPS2\_499, тогда как уровень активности pEYK1-3AB при индукции 1,5%-ным эритритолом был сопоставим с уровнем немодифицированных pRPS2 и pRPL22. При гетерологичной экспрессии генов *CarRP-GGPPS7* под контролем исследуемых промоторов наибольшая продукция  $\beta$ -каротина наблюдалась в рекомбинантном штамме *Y. lipolytica* с промотором pEXP1, тогда как промотор hybRPS2\_499 показал результат, сопоставимый с индуцибельным промотором pEYK1-3AB при добавлении 1,5% эритритола. Таким образом, показано, что сильный конститутивный промотор может успешно конкурировать с индуцибельным вариантом при построении гетерологичных биосинтетических путей в дрожжах *Y. lipolytica*. При этом использование самого сильного из исследованных промоторов не привело к самому высокому выходу целевого продукта, поэтому для быстрой идентификации наилучшего штамма-продуцента необходима апробация широкого спектра промоторов различной силы.<sup>1</sup>

**Ключевые слова:** *Yarrowia lipolytica*, конститутивные промоторы, синтетические промоторы, метаболическая инженерия,  $\beta$ -каротин

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

**Соблюдение этических стандартов.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

**Конфликт интересов.** Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

**Ссылка для цитирования:** Черенкова А.А., Таратынова М.О., Мелькина О.Е. Сравнение эффективности различных промоторов при продукции  $\beta$ -каротина в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology. 2026. Т. 62. № 1. С. 42–53. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010037>

© А. А. Черенкова, М. О. Таратынова, О. Е. Мелькина, 2026

<sup>1</sup> Сокращения: ВНТ (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) — 6-дитретбутил-4-метилфенола; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

## COMPARISON OF DIFFERENT PROMOTERS' EFFICIENCY BY $\beta$ -CAROTENE PRODUCTION IN YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA*

A.A. Cherenkova\*, M.O. Taratynova, O.E. Melkina

*Complex of NBICS Technologies, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation*

\*E-mail: [anncheren@gmail.com](mailto:anncheren@gmail.com)

**Abstract.** In the metabolic engineering of producer strains strong constitutive promoters are an attractive alternative to inducible promoters since they do not require the addition of expensive and sometimes toxic inducing substances to the fermentation medium. In this work, we performed a comparison of the *Yarrowia lipolytica* constitutive promoters pEXP1, pRPS2, pRPL22 (native) and hybRPS2\_499, hybRPL22 (synthetic) with the inducible promoter pEYK1-3AB. The synthetic promoters hybRPS2 and hybRPL22 are modified versions of the ribosomal promoters pRPS2 and pRPL22, respectively. Initially, promoters' strength was assessed by the expression level of the reporter gene encoding the green fluorescent protein hrGFP. It was shown that the strength of the promoters increased in the following order: pRPS2, pRPL22, pEXP1, hybRPL22, hybRPS2\_499, while the level of pEYK1-3AB activity with 1.5 % erythritol induction was comparable to the level of unmodified pRPS2 and pRPL22. During heterologous expression of the *CarRP-GGPPSs7* genes under the control of the studied promoters, the highest  $\beta$ -carotene production was observed in the recombinant *Y. lipolytica* strain with the pEXP1 promoter, while the hybRPS2\_499 promoter showed a result comparable to the pEYK1-3AB promoter induced by addition of 1.5 % erythritol. Thus, we have shown that in constructing heterologous biosynthetic pathways in *Y. lipolytica* a strong constitutive promoter can successfully compete with an inducible variant. However, in our case, the use of the strongest promoter did not lead to the highest yield of the target product. Therefore, rapid identification of the best producer strain requires testing a wide range of promoters of varying strengths.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, constitutive promoters, synthetic promoters, metabolic engineering,  $\beta$ -carotene

**Funding.** This work was performed within the framework of a State Assignment for the Federal Research Center Kurchatov Institute.

**Ethics declarations.** This work does not contain any studies involving human or animal subjects.

**Conflict of interests.** The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

**Authors contribution.** All authors made a significant contribution to the development of the concept, conduct of the study, and preparation of the article.

**For Citation:** Cherenkova A.A., Taratynova M.O., Melkina O.E. Comparison of different promoters' efficiency by  $\beta$ -carotene production in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(1):42–53. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010037>

## ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* являются микробной платформой для метаболической инженерии штаммов-продуцентов широкого спектра соединений, включая вещества липидной природы, каротиноиды и другие терпеноиды, органические кислоты, многоатомные спирты, рекомбинантные белки [1, 2].

В метаболической инженерии промоторы относятся к ключевым регуляторным элементам. Типичная промоторная последовательность дрожжей включает основной (коровый) элемент и расположенную выше регуляторную область [3, 4]. Коровый промотор обеспечивает базовый уровень экспрессии гена. Его длина составляет около 100–200 п.н., включая ТАТА-последовательность, с которой связывается РНК-полимераза II и начинается процесс транскрипции [5–7]. Регуляторная область содержит сайты узнавания факторов транскрипции, которые, взаимодействуя с транскрипционным комплексом или ремоделерами хроматина, активируют или репрессируют процесс синтеза РНК [4, 8].

В настоящее время исследованы и модифицированы различные промоторы *Y. lipolytica*, обладающие конститутивным или индуцибельным характером экспрессии [3, 9]. Например, промоторы рEXP1 (гена внеклеточной щелочной протеазы) [10] и рTEF1 (гена фактора элонгации трансляции I $\alpha$ ) [11] с сильной конститутивной экспрессией используются для решения многих практических задач [3, 12, 13]. Востребованным также является индуцибельный промотор рEYK1 гена киназы эритролузы, который активируется хорошо растворимыми в воде эритролузом и эритролузой [14]. Особенно часто используют его модифицированные виды рEYK1-2AB или рEYK1-3AB с несколькими копиями активирующей последовательности UAS перед коровым элементом [15].

С целью достижения высоких выходов целевых продуктов в штаммах *Y. lipolytica*, как правило, применяют общедоступные сильные эндогенные про-

моторы, такие как рTEF1, рEXP1, рTDH1, рFBA1, рGPM1 и др. [16]. При этом в случае использования сильных конститутивных промоторов и их активирующих элементов перед разработчиками штаммов встает проблема чрезмерной метаболической нагрузки на клетки продуцента в связи с конкуренцией между процессами клеточного роста и биосинтеза продукта [17, 18], которая частично решается применением индуцибельных промоторов и добавлением индуктора в определенной фазе ферментации. В то же время использование сильных промоторов при построении гетерологичных биосинтетических путей в штаммах *Y. lipolytica* не всегда приводит к высокому выходу целевого продукта [19], поэтому апробация широкого спектра промоторов различной силы является необходимым условием быстрой идентификации наилучшей конструкции и штамма-продуцента [19, 20].

Цель настоящей работы — сравнение эффективности ряда конститутивных промоторов рEXP1, рRPS2 и hybRPS2\_499 с индуцируемым эритролузом промотором рEYK1-3AB при гетерологичной экспрессии слитых генов *CarRP-GGPPSs7* — ключевых ферментов продукции  $\beta$ -каротина — под контролем исследуемых промоторов в дрожжах *Y. lipolytica*.

## МЕТОДИКА

*Штаммы микроорганизмов и плазмиды*

В работе использовали штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica*, представленные в табл. 1.

Для конструирования плазмид и наработки плазмидной ДНК использовали штаммы *Escherichia coli* TOP10 (F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1  $\lambda$ <sup>-</sup>) и XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F<sup>+</sup> proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10(Tetr)]).

Плазмиды, использованные в работе для сборки генетических конструкций, представлены в табл. 2.

Таблица 1. Штаммы дрожжей *Y. lipolytica*Table 1. *Y. lipolytica* strains

Штамм	Генотип	Родительский штамм	Плаزمида для интеграции	Источник или ссылка
ВКПМ Y-4972	W29 $\Delta ku70::URA3$	—	—	[21]
ВКПМ Y-4973	W29 $\Delta ku70 \Delta ura3$	—	—	[21]
ВКПМ Y-4967	W29 $\Delta ku70 \Delta ura3 \Delta pex10 P_{hp4d}^- ACBP P_{hp4d}^- ZWF1 P_{hp4d}^- ACC1 P_{TEF_{in}}^- DGA1 P_{TEF_{in}}^- ScSUC2 P_{TEF_{in}}^- HXK1$	—	—	[22]

Таблица 1. Продолжение

Table 1. (Contd.)

Y-1490	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P <sub>EXP1</sub> - <i>hrGFP</i> - T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4973	pProUA-P <sub>EXP1</sub> - <i>hrGFP</i> - T <sub>LIP2</sub> (NotI)	[21]
Y-1391	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P <sub>RPL22</sub> - <i>hrGFP</i> - T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4973	pProUA-P <sub>RPL22</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub> (NotI)	[21]
Y-1439	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P <sub>RPS2</sub> - <i>hrGFP</i> - T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4973	pProUA-P <sub>RPS2</sub> - <i>hrGFP</i> - T <sub>LIP2</sub> (NotI)	[21]
YI-hybRPL22	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P <sub>hybRPL22</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4973	pProUA-P <sub>hybRPL22</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub> (NotI)	Данная работа
YI-hybRPS_499	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P <sub>hybRPS2_499</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4973	pProUA-P <sub>hybRPS2_499</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub> (NotI)	Данная работа
Y-1756	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P <sub>EYK1-3AB</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4973	pProUA-P <sub>EYK1-3AB</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub> (NotI)	Данная работа
YI-2322	W29 $\Delta ku70 \Delta pex10$ P <sub>hp4d</sub> - <i>ACBP</i> P <sub>hp4d</sub> - <i>ZWF1</i> P <sub>hp4d</sub> - <i>ACC1</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>DGA1</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>ScSUC2</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>HXK1</i> IntC2::P <sub>EXP1</sub> - <i>CarRP-GGPPs7</i> - T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4967	pC2UA2.2- P <sub>EXP1</sub> - <i>CarRP-GGPPs7</i> - T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub> (SmiI)	Данная работа
YI-2503	W29 $\Delta ku70 \Delta pex10$ P <sub>hp4d</sub> - <i>ACBP</i> P <sub>hp4d</sub> - <i>ZWF1</i> P <sub>hp4d</sub> - <i>ACC1</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>DGA1</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>ScSUC2</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>HXK1</i> IntC2::P <sub>RPS2</sub> - <i>CarRP-GGPPs7</i> - T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4967	pC2UA2.2- P <sub>RPS2</sub> - <i>CarRP-GGPPs7</i> - T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub> (SmiI)	Данная работа
YI-2467	W29 $\Delta ku70 \Delta pex10$ P <sub>hp4d</sub> - <i>ACBP</i> P <sub>hp4d</sub> - <i>ZWF1</i> P <sub>hp4d</sub> - <i>ACC1</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>DGA1</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>ScSUC2</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>HXK1</i> IntC2::P <sub>hybRPS2_499</sub> - <i>CarRP-GGPPs7</i> - T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4967	pC2UA2.2- P <sub>hybRPS2_499</sub> - <i>CarRP-GGPPs7</i> - T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub> (SmiI)	Данная работа
YI-1192	W29 $\Delta ku70 \Delta pex10$ P <sub>hp4d</sub> - <i>ACBP</i> P <sub>hp4d</sub> - <i>ZWF1</i> P <sub>hp4d</sub> - <i>ACC1</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>DGA1</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>ScSUC2</i> P <sub>TEFin</sub> - <i>HXK1</i> IntC2::P <sub>EYK1-3AB</sub> - <i>CarRP-GGPPs7</i> - T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub>	ВКПМ Y-4967	pC2UA2.2-P <sub>EYK1-3AB</sub> - <i>CarRP-GGPPs7</i> - T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub> (SmiI)	Данная работа

**Таблица 2.** Плазмиды, использованные в данной работе**Table 2.** Plasmids used in this study

Название плазмид	Детали сборки	Источник или ссылка
Вспомогательные плазмиды для сборки методом Golden Gate		
pProUA-mScarlet	–	[21]
pC2US1.1	–	[21]
pYTK001- <i>CarRP</i> -fus	–	[22]
pYTK001-fus- <i>GGPPs7</i>	–	[22]
pTerC-ScADH1	–	[21]
pC2US1.1-P <sub>EXP1</sub> - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T <sub>ScADH1</sub>	GGA – Eco31I: pC2US1.1 + pProUA-pEXP1 + pYTK001- <i>CarRP</i> -fus + pYTK001-fus- <i>GGPPs7</i> + pTerC-ScADH1	Данная работа
pC2US1.1-P <sub>RPS2</sub> - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T <sub>ScADH1</sub>	GGA – Eco31I: pC2US1.1 + pProUA-pRPS2 + pYTK001- <i>CarRP</i> -fus + pYTK001-fus- <i>GGPPs7</i> + pTerC-ScADH1	Данная работа
pC2US1.1-P <sub>hybRPS2_499</sub> - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T <sub>ScADH1</sub>	GGA – Eco31I: pC2US1.1 + pProUA-hybRPS2_499 + pYTK001- <i>CarRP</i> -fus + pYTK001-fus- <i>GGPPs7</i> + pTerC-ScADH1	Данная работа
pC2US1.1-P <sub>EYK1-3AB</sub> - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T <sub>ScADH1</sub>	GGA – Eco31I: pC2US1.1 + pProUA-pEYK1-3AB + pYTK001- <i>CarRP</i> -fus + pYTK001-fus- <i>GGPPs7</i> + pTerC-ScADH1	Данная работа
pC2US1.2	–	[21]
pProC-TEF1	–	[21]
pYTK001- <i>CarB</i>	–	[22]
pTerC-LIP2	–	[21]
pC2US1.2-P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub>	GGA – Eco31I: pC2US1.2 + pProC-TEF1 + pYTK001- <i>CarB</i> + pTerC-LIP2	Данная работа
pC2UA2.2	–	[21]
Эписомальные Cas9-вспомогательные плазмиды		
pCasNA-IntC2	–	[21]
Экспрессионные плазмиды		
pProUA-P <sub>EXP1</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	–	[21]
pProUA-P <sub>RPL22</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	–	[21]
pProUA-P <sub>RPS2</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	–	[21]
pProUA-P <sub>hybRPL22</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	GGA – BpiI: pProUA-mScarlet + ПЦП-продукт hybRPL22	Данная работа
pProUA-P <sub>hybRPS2_499</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	GGA – BpiI: pProUA-mScarlet + ПЦП-продукт hybRPS2_499	Данная работа
pProUA-P <sub>EYK1-3AB</sub> - <i>hrGFP</i> -T <sub>LIP2</sub>	–	[21]
pC2UA2.2-P <sub>EXP1</sub> - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T <sub>ScADH1</sub> -P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub>	GGA – Esp3I: pC2UA2.2 + pC2US1.1-P <sub>EXP1</sub> - <i>CarRP</i> - <i>GGPPs7</i> -T <sub>ScADH1</sub> + pC2US1.2-P <sub>TEF1</sub> - <i>CarB</i> -T <sub>LIP2</sub>	Данная работа

Таблица 2. Продолжение

Table 2. (Contd.)

$pC2UA2.2-P_{RPS2}^{-}CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1}^{-}P_{TEF1}^{-}CarB-T_{LIP2}$	GGA – Esp3I: $pC2UA2.2 + pC2US1.1-P_{RPS2}^{-}CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1} + pC2US1.2-P_{TEF1}^{-}CarB-T_{LIP2}$	Данная работа
$pC2UA2.2-P_{ScADH1}^{-}P_{TEF1}^{-}CarB-T_{LIP2}$	GGA – Esp3I: $pC2UA2.2 + pC2US1.1-P_{hybRPS2\_499}^{-}CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1} + pC2US1.2-P_{TEF1}^{-}CarB-T_{LIP2}$	Данная работа
$pC2UA2.2-P_{ScADH1}^{-}P_{EYK1-3AB}^{-}CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1}^{-}P_{TEF1}^{-}CarB-T_{LIP2}$	GGA – Esp3I: $pC2UA2.2 + pC2US1.1-P_{EYK1-3AB}^{-}CarRP-GGPPs7-T_{ScADH1} + pC2US1.2-P_{TEF1}^{-}CarB-T_{LIP2}$	Данная работа

**Сборка генетических конструкций и получение штаммов *Y. lipolytica***

Для оценки силы промоторов pEXP1, pRPS2, pRPL22, pEYK1-3AB их нуклеотидные последовательности были химически синтезированы компанией Twist Bioscience (США) и встроены в предоставленный компанией вектор pProUA-mScarlet (табл. 2) непосредственно перед геном-репортером *hrGFP* [21]. Синтетические гибридные промоторы *hybRPS2\_499*, *hybRPL22* были получены методом ПЦР путем слияния последовательностей промоторов pRPS2, pRPL22 с активирующей последовательностью, изолированной из рибосомного промотора pRPL25 *Y. lipolytica*. Далее ПЦР-продукты встраивали по сайтам рестрикции *BpiI* в вектор pProUA-mScarlet непосредственно перед геном *hrGFP* методом Golden Gate Assembly (GGA) по ранее описанному протоколу [21]. Правильность сборки плазмид проверяли секвенированием по Сэнгеру.

Полученные экспрессионные плазмиды (табл. 2) линеаризовали по сайтам рестрикции *NotI* и интегрировали в локус *IntC2* хромосомы С штамма *Y. lipolytica* Y-4973 (табл. 1). Трансформацию дрожжей проводили совместно с эписомальной Cas9-вспомогательной плазмидой pCasNA-IntC2 (табл. 2) химическим методом, как описано в работе [21]. Трансформанты отбирали по прототрофности по урацилу (ген-маркер *URA3*). Дополнительно проводили верификацию отобранных трансформантов с помощью ПЦР.

Штаммы-продуценты β-каротина были получены на основе штамма *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4967 (табл. 1) путем интеграции в локус *IntC2* хромосомы С экспрессионной кассеты, включающей ген бифункционального фермента фитоенсинтазы/ликопин-β-циклазы (*CarRP*) *Mucor circinelloides*, слитый с геном геранилгеранилдифосфат-синтазы (*GGPPs7*) *Synechococcus* sp., и ген фитоендегидрогеназы (*CarB*) *M. circinelloides* [22]. При этом ген *CarRP-GGPPs7* расположен под контролем одного из исследуемых промоторов, а ген *CarB* — под

контролем сильного конститутивного промотора *Y. lipolytica* pTEF1 [11].

Экспрессионные плазмиды для интеграции были сконструированы методом GGA [21] из вспомогательных плазмид, перечисленных в табл. 2. Предварительно все вспомогательные плазмиды были проверены на правильность сборки секвенированием по Сэнгеру. Сконструированные экспрессионные плазмиды (табл. 2) линеаризовали по сайтам рестрикции *SmiI* и трансформировали в штамм ВКПМ Y-4967 совместно с плазмидой pCasNA-IntC2 химическим методом [21]. Правильность интеграции проверяли методом ПЦР. В результате для каждого из исследуемых промоторов был отобран штамм-трансформант с интегрированной в *IntC2* локус экспрессионной кассетой.

**Питательные среды и условия роста**

Штаммы *E. coli* выращивали при 37 °C в среде LB (г/л): триптон — 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 5, при необходимости добавляли ампициллин (100 мкг/мл), хлорамфеникол (120 мкг/мл) или спектиномицин (50 мкг/мл).

Штаммы дрожжей *Y. lipolytica* культивировали при 30 °C на минимальной среде YNBD 0,67 г/л (“HiMedia” M139, Индия) или на полноценной среде YPD (дрожжевой экстракт — 5 г/л, пептон — 10 г/л), содержащих 1 % глюкозы в качестве источника углерода. При необходимости добавляли нурсеотрицин (Nat) в концентрации 250 мкг/мл. Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/л.

**Ферменты и химические вещества**

Ферменты для работы с ДНК получены от Fermentas (Литва) и Thermo Fisher Scientific (США). Все химические препараты были аналитической чистоты.

**Измерение флуоресценции**

Активность промоторов *Y. lipolytica* оценивали по экспрессии кодон-оптимизированного гена-репортера, кодирующего зеленый флуоресцентный

белок *Renilla* (hrGFP) [21]. Для индуцибельного промотора рEYK1-3AB выращенную в YPD посевную культуру засеивали в пробирку с жидкой средой YNBD и культивировали 16 ч при 30 °C и 250 об./мин. Затем по 100 мкл культуры переносили в лунки микропланшета с черными стенками и прозрачным дном 655096 “Greiner Bio-One” (Германия) и добавляли эритритол в различных концентрациях в 5 лунок для каждой. В качестве контроля использовали лунки с 100 мкл среды YNBD и эритритолом. Планшет помещали в мультимодальный ридер CLARIOstar Plus “BMG Labtech” (Германия) и измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм ( $OD_{600}$ ) и флуоресценцию (FLU) при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 495/535$  нм в течение 24 ч при 30 °C и 500 об./мин. Коэффициент усиления фотоумножителя автоматически контролировался функцией расширенного динамического диапазона. Измеренные значения были нормированы на время накопления 1 с. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения MARS и Microsoft Excel. Измерения корректировали путем вычитания значений  $OD_{600}$  и FLU контрольных лунок из соответствующих значений опытных лунок. Относительную флуоресценцию для каждой лунки рассчитывали путем деления скорректированных значений FLU на  $OD_{600}$ .

Для оценки активности всех промоторов посевные культуры соответствующих штаммов выращивали в жидкой среде YPD в течение 24 ч, после чего засеивали в пробирки, содержащие 2 мл YPD, с доведением оптической плотности до 0,1  $OD_{600}$ . Штаммы культивировали при 30 °C и 250 об./мин в течение 2 сут. Для штамма с промотором рEYK1-3AB при засеивании и после 24 ч культивирования дополнительно добавляли 1,5 % эритритола. Раз в сутки отбирали по 100 мкл культуры, осаждали клетки центрифугированием (12000 g в течение 1 мин) и промывали в 100 мкл стерильной дистиллированной воды. Промытую биомассу использовали для визуальной оценки интенсивности зеленой флуоресценции в синем светодиодном трансиллюминаторе DR46B “Clare Chemical Research” (Великобритания) с оранжевым фильтром. Затем биомассу ресуспендировали в 100 мкл воды и разводили в 10 раз с целью корректного измерения значений оптической плотности и флуоресценции. По 100 мкл полученных суспензий переносили в лунки микропланшета, который затем помещали в мультимодальный ридер и измеряли оптическую плотность  $OD_{600}$  и флуоресценцию FLU. Полученные данные обрабатывали аналогично вышеописанному алгоритму.

#### Оценка продукции $\beta$ -каротина

Для оценки продукции  $\beta$ -каротина рекомбинантные штаммы *Y. lipolytica* культивировали в среде YPD с 9 % глюкозы. Посев инокулята вели до значения 0,1  $OD_{600}$ . Культивирование проводили в

пробирках на 50 мл с рабочим объемом 10 мл при температуре 29 °C и постоянном перемешивании 275 об./мин на протяжении 5 сут. Для штамма с индуцибельным промотором рEYK1-3AB проводилась подпитка эритритолом в концентрации 1,5% на 2 и 3 сутки культивирования.

Каротиноиды экстрагировали из лиофилизированных клеток. Для этого к 6–10 мг лиофилизованного образца добавляли 400 мг кварцевого песка фракцией 0,016–0,08 мм и 400 мкл дистиллированной воды. Образцы встряхивали на гомогенизаторе Precellys®24 “Bertin Technologies” (Франция) при 5500 об./мин 2 цикла по 30 с, охлаждали на льду в течение 1 мин и повторяли 2 цикла гомогенизации с последующим охлаждением. Далее к образцам добавляли 1250 мкл хлороформа, содержащего 0,01%-ный 2,6-дитретбутил-4-метилфенола (ВНТ), и проводили еще 2 цикла гомогенизации с охлаждением, после чего центрифугировали при 18 000 g и собирали супернатант. Образцы выпаривали на центрифужном испарителе Concentrator Plus “Eppendorf” (Германия) и перерастворяли в ацетоне, содержащем 0,01 % ВНТ.

Содержание каротиноидов в полученных экстрактах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы Dionex UltiMate 3000 “Thermo Scientific” (США), оснащенной колонкой WAT086344 C18 3,9×150 мм, 4 мкм, 60А, 1/рк “Nova-Pak” (США), с температурой колонки 50 °C. Элюент (подвижная фаза) — ацетон : вода : метанол в соотношении 90:10:10 (мл). Скорость потока составляла 1 мл/мин в изократическом режиме. Измерение проводили на диодно-матричном детекторе при 470 нм. Образцы были идентифицированы путем сравнения времени удерживания со стандартами  $\beta$ -каротина “Supelco” (Германия). Данные измерений использовали для расчета выхода  $\beta$ -каротина в виде мг/г высушенной биомассы и мг/л.

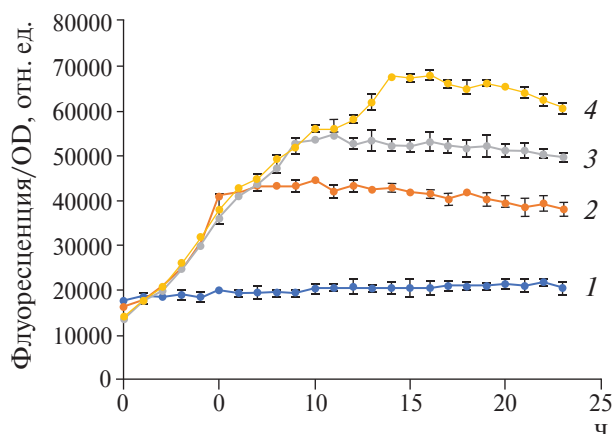
#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка силы промоторов по уровню экспрессии гена-репортера

На первом этапе силу (активность) исследуемых промоторов сравнивали по уровню экспрессии гена-репортера *hrGFP* путем измерения относительной флуоресценции ( $FLU/OD_{600}$ ) дрожжевых клеток соответствующих штаммов *Y. lipolytica* (табл. 1).

Предварительно для эритритольного промотора рEYK1-3AB была определена степень открытия при различных концентрациях индуктора. Для этого штамм Y-1756 выращивали в минимальной среде YNBD, содержащей 0 (контроль), 0,5, 1,0 или 1,5 % эритритола, в течение 24 ч при 30 °C и 500 об./мин с измерением оптической плотности и флуоресценции, как описано в методической

части. Полученные кривые нормализованной по оптической плотности флуоресценции приведены на рис. 1.

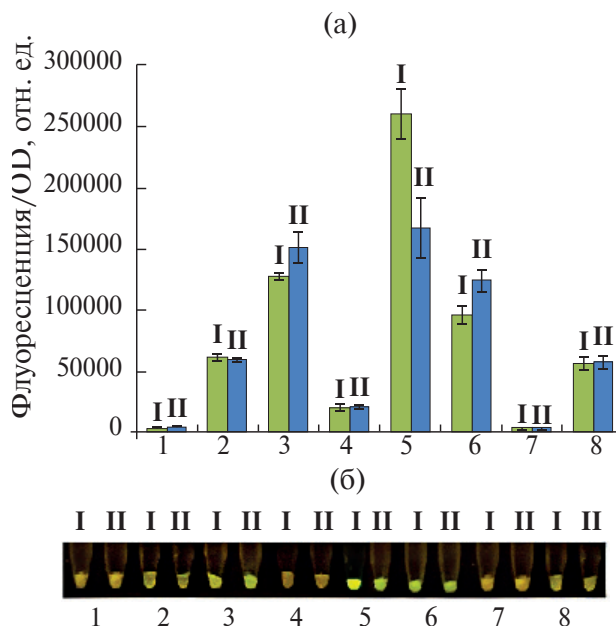


**Рис. 1.** Кривые нормализованной по оптической плотности флуоресценции штамма Y-1756 с геном-репортером *hrGFP* под контролем промотора pEYK1-3AB при культивировании в минимальной среде YNBD, содержащей 0 (1), 0,5 (2), 1 (3) или 1,5 (4) % эритритола. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение, рассчитанное на основе 5 повторностей для каждой концентрации

**Fig. 1.** Curves of the fluorescence normalized by the optical density (OD) of the Y-1756 strain with the *hrGFP* reporter-gene under the control of the pEYK1-3AB promoter when cultivated in minimal YNBD medium containing 0 (1), 0.5 (2), 1 (3), or 1.5 (4) % erythritol. Error bars represent the standard deviation calculated based on 5 replicates for each concentration

Как видно, добавление эритритола вызывало усиление относительной флуоресценции, при этом чем больше концентрация индуктора, тем больше амплитуда ответа. С учетом этого, в последующих экспериментах для индукции промотора pEYK1-3AB в среду культивирования добавляли 1,5 % эритритола. В таких условиях при всех протестированных концентрациях активация промотора происходила спустя 30–40 мин культивирования, а максимальная степень открытия приходилась на 15–16 ч роста клеток дрожжей.

Для сравнения активности всех исследуемых промоторов штаммы дрожжей выращивали в полноценной среде YPD при 30 °C при 250 об./мин в течение 2 сут. Раз в сутки (24 и 48 ч соответственно) проводилась визуальная оценка интенсивности зеленой флуоресценции выросшей биомассы с последующим измерением оптической плотности и флуоресценции согласно алгоритму, описанному в методике. Результаты представлены на рис. 2.



**Рис. 2.** Оценка промоторной активности в штаммах *Y. lipolytica*, культивированных в среде YPD в течение 1 (I) и 2 (II) сут.: а — уровень нормализованной по оптической плотности флуоресценции клеток штамма без интеграции (1) и штаммов с промоторами pRPL22 (2), *hybRPL22* (3), pRPS2 (4), *hybRPS2\_499* (5), pEXP1 (6), pEYK1-3AB без индукции (7) и pEYK1-3AB с индукцией 1,5%-ным эритритолом (8); б — визуальная оценка интенсивности зеленой флуоресценции биомассы соответствующих штаммов на 1 и 2 сут. культивирования. Стандартное отклонение рассчитано на основе 3 повторностей для каждого штамма

**Fig. 2.** Evaluation of promoter activity in *Y. lipolytica* strains cultured in YPD medium for 1 (I) and 2 (II) days: a — level of fluorescence normalized by optical density of cells of the strain without integration (1) and strains with promoters pRPL22 (2), *hybRPL22* (3), pRPS2 (4), *hybRPS2\_499* (5), pEXP1 (6), pEYK1-3AB without induction (7) and pEYK1-3AB with induction by 1.5% erythritol (8); b — visual assessment of the biomass green fluorescence intensity of the corresponding strains on 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> days of cultivation. The standard deviation is calculated based on 3 replicates for each strain

По данным рис. 2 видно, что на первые сутки культивирования наибольший уровень активности наблюдали с синтетическим конститутивным промотором *hybRPS2\_499*, превосходившим уровень исходного pRPS2 в 13 раз. Далее по уровню активности следовал так же синтетический *hybRPL22*, который превосходил уровень исходного pRPL22 примерно в 2 раза. Вместе с этим, активность *hybRPS2\_499* и *hybRPL22* превышала активность нативного конститутивного

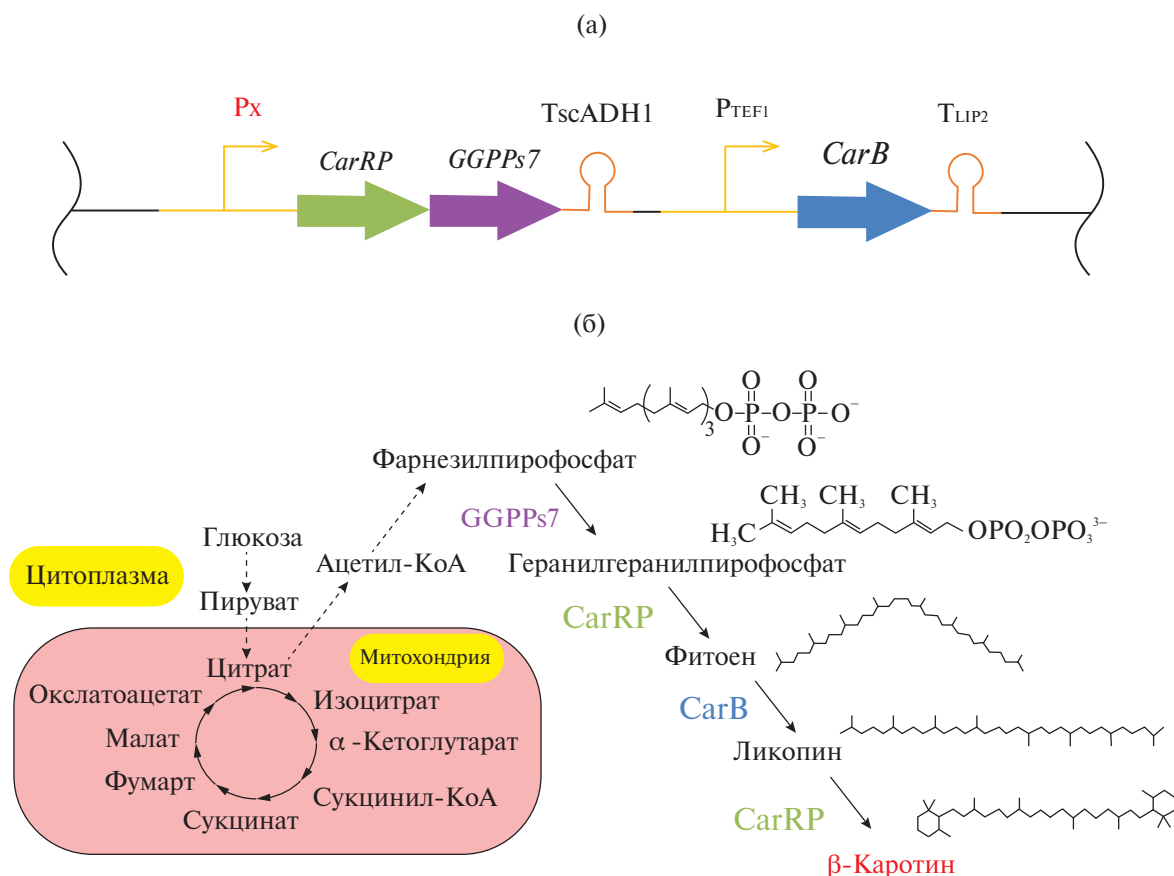
промотора pEXP1. Уровень активности синтетического индуцибельного промотора pEYK1-3AB при добавлении эритритола был сопоставим с уровнем немодифицированных pRPS2 и pRPL22, тогда как без индуктора флуоресценция биомассы штамма с данным промотором не отличалась от флуоресценции биомассы контрольного штамма без интеграции.

На 2 сут. культивирования уровень активности *hybRPS2\_499* заметно снижался и становился сопоставимым с немного возросшей активностью промоторов *hybRPL22* и pEXP1. В то же время активность нативных промоторов pRPS2, pRPL22 и индуцибельного pEYK1-3AB практически не менялась.

Приведенные результаты показали, что конститутивные промоторы *hybRPS2\_499*, *hybRPL22* и pEXP1 обеспечивали более высокий уровень экспрессии гена-репортера *hrGFP*, чем индуцибельный промотор pEYK1-3AB при данных условиях культивирования.

### Оценка эффективности промоторов при продукции $\beta$ -каротина рекомбинантными штаммами *Y. lipolytica*

Для сравнения эффективности исследуемых промоторов в контексте продукции конкретного метаболита под их контролем была осуществлена гетерологичная экспрессия ключевых генов пути синтеза  $\beta$ -каротина в дрожжах *Y. lipolytica*. Были сконструированы рекомбинантные штаммы (табл. 1), в геном которых интегрирована экспрессионная кассета, включающая ген фитоенсинтазы/ликопин- $\beta$ -циклазы (*CarRP*), слитый с геном геранилгеранилдифосфат-синтазы (*GGPPs7*) [22], под регуляцией промоторов pEXP1, pRPS2, *hybRPS2\_499* или pEYK1-3AB ( $P_x$ ), и ген фитоендегидрогеназы (*CarB*) [22] под контролем конститутивного промотора pTEF1 ( $P_{TEF1}$ ). Мы решили не рассматривать промотор *hybRPL22*, поскольку его сила сопоставима с нативным pEXP1. На рис. 3 схематично изображены экспрессионная кассета и схема метаболического пути синтеза  $\beta$ -каротина в клетках дрожжей *Y. lipolytica*.



**Рис. 3.** Схема экспрессионной кассеты (а) и метаболического пути синтеза  $\beta$ -каротина (б) в клетках рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* с обозначением ключевых ферментов: GGPPs7 — геранилгеранилдифосфат-синтаза, CarRP — фитоенсинтаза/ликопин- $\beta$ -циклаза, CarB — фитоендегидрогеназа

**Fig. 3.** Scheme of the expression cassette (a) and the metabolic pathway for  $\beta$ -carotene synthesis (b) in cells of recombinant *Y. lipolytica* strains with the designation of key enzymes: GGPPs7 — geranylgeranyl diphosphate synthase, CarRP — phytoene synthase/lycopene  $\beta$ -cyclase, CarB — phytoene dehydrogenase

Для оценки продукции β-каротина проводили культивирование штаммов в среде YPD с 9 % глюкозы на протяжении 5 суток как описано в методической части. После лиофилизации биомассы,

экстракции каротиноидов и анализа ВЭЖХ было рассчитано накопление биомассы (г сухой биомассы/л) и β-каротина (мг/г сухого веса и мг/л). Результаты представлены в табл. 3.

**Таблица 3.** Результаты культивирования рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* продуцентов β-каротина в среде YPD с 9 % глюкозы в течение 5 сут.

**Table 3.** Results of cultivation recombinant *Y. lipolytica* strains producing β-carotene in YPD medium with 9 % glucose for 5 days

Штамм	Промотор	Биомасса*, г/л	β-каротин, мг/г сухого веса	β-каротин, мг/л
YI-2322	pEXP1	24,0 ± 1,2	19,4 ± 0,8	463,9 ± 21,1
YI-2503	pRPS2	19,9 ± 0,3	1,9 ± 0,3	36,9 ± 3,6
YI-2467	hybRPS2_499	21,8 ± 0,3	8,8 ± 0,3	189,3 ± 3,6
YI-1192	pEYK1-3AB без индукции	23,7 ± 0,3	3,4 ± 0,1	81,0 ± 1,4
	pEYK1-3AB индукция 1,5 % об. эритритола	16,4 ± 0,6	10,7 ± 0,9	171,3 ± 11,4

\*В расчете на сухую массу. Стандартное отклонение рассчитано на основе 3 повторностей для каждого штамма.

Based on dry weight. Standard deviation calculated based on 3 replicates for each strain.

Как видно, рекомбинантные штаммы *Y. lipolytica* не сильно различались по накоплению биомассы. Наибольший выход β-каротина наблюдался в штамме YI-2322, в котором экспрессия генов *CarRP-GGPPs7* регулируется нативным конститутивным промотором pEXP1, тогда как при регуляции синтетическим промотором hybRPS2\_499 в штамме YI-2467 результат сопоставим с индукционным промотором pEYK1-3AB при культивировании штамма YI-1192 с подпиткой эритритолом. Наименьшую продукцию β-каротина обеспечил немодифицированный промотор pRPS2 (штамм YI-2503), а также pEYK1-3AB при культивировании штамма YI-1192 без эритритола.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученный выход β-каротина на штамме YI-2322 с нативным конститутивным промотором pEXP1 почти в 2 раза уступал выходу, достигнутому на ранее разработанных штаммах-продуцентах *Y. lipolytica* [23–26]. Тем не менее, полученные результаты позволяют заключить, что в одинако-

вых условиях культивирования рекомбинантных штаммов-продуцентов *Y. lipolytica* конститутивный промотор может успешно конкурировать с индукционным вариантом. При этом использование самого сильного из исследованных промоторов (hybRPS2\_499) для регуляции гетерологичных генов *CarRP-GGPPs7* не приводило к самому высокому выходу β-каротина. Это можно объяснить, с одной стороны, тем, что на вторые сутки экспрессия генов с промотора hybRPS2\_499 снижалась, в то время как для pEXP1 — наоборот возрастала (рис. 2). С другой стороны, известно, что в некоторых случаях применение сильных промоторов при построении биосинтетических путей приводит к чрезмерной метаболической нагрузке на клетки продуцента и снижает показатели выхода целевого продукта [17, 18]. Возможно, в настоящей работе столкнулись именно с этим вариантом и в очередной раз показали, что для быстрой идентификации наилучшего штамма-продуцента необходима апробация широкого спектра промоторов различной силы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Harzevili F.D. *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. Springer Cham., 2014. 74 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06437-6>
2. Park Y.K., Ledesma-Amaro R. What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? *Trends Biotechnol.* 2023. V. 41. № 2. P. 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.006>
3. Sun M.L., Shi T.Q., Lin L., Ledesma-Amaro R., Ji X.J. Advancing *Yarrowia lipolytica* as a superior biomanufacturing platform by tuning gene expression using promoter engineering. *Bioresour. Technol.* 2022. V. 347. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126717>
4. Blazeck J., Alper H.S. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnol. J.* 2013. V. 8. № 1. P. 46–58. <https://doi.org/10.1002/biot.201200120>

5. Portela R.M., Vogl T., Kniely C., et al. Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species. *ACS Synth. Biol.* 2017. V. 6. № 3. P. 471–484. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00178>
6. Lubliner S., Regev I., Lotan-Pompan M., et al. Core promoter sequence in yeast is a major determinant of expression level. *Gen. Res.* 2015. V. 25. № 7. P. 1008–1017. <https://doi.org/10.1101/gr.188193.114>
7. Haberle V., Stark A. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 10. P. 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
8. Hahn S., Young, E.T. Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics.* 2011. V. 189. № 3. P. 705–736. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127019>
9. Hu M., Ge J., Jiang Y., et al. Advances and perspectives in genetic expression and operation for the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2024. V. 9. № 4. P. 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2024.05.003>
10. Davidow L.S., O'Donnell M.M., Kaczmarek F.S., et al. Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. № 10. P. 4621–4629. <https://doi.org/10.1128/jb.169.10.4621-4629.1987>
11. Müller S., Sandal T., Kamp-Hansen P., Dalbøge H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast (Chichester, England)*. 1998. V. 14. № 14. P. 1267–1283. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(1998100\)14:14](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(1998100)14:14)
12. Wang C., Lin M., Yang Z., et al. Characterization of the endogenous promoters in *Yarrowia lipolytica* for the biomanufacturing applications. *Process Biochem.* 2023. V. 124. P. 245–252.
13. Gu Y., Ma J., Zhu Y., Xinyu D., Xu P. Coupling metabolic addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield. *ACS Synth. Biol.* 2020. V. 9. № 8. P. 2096–2106. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00185>
14. Trassaert M., Vandermies M., Carly F., et al. New inducible promoter for gene expression and synthetic biology in *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell Fact.* 2017. V. 16. № 1. P. 141. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0755-0>
15. Park Y.K., Korpys P., Kubiak M., et al. Engineering the architecture of erythritol-inducible promoters for regulated and enhanced gene expression in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research.* 2019. V. 19. № 1. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy105>
16. Madzak C., Gaillardin C., Beckerich, J.M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J. Biotechnol.* 2004. V. 109. № 1–2. P. 63–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.027>
17. Wu G., Yan, Q., Jones, J. A., et al. Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. *Trends in Biotechnol.* 2016. V. 34. № 8. P. 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.010>
18. Bu Q.T., Li Y.P., Xie H., et al. Rational engineering strategies for achieving high-yield, high-quality and high-stability of natural product production in actinomycetes. *Metabol. Eng.* 2021. V. 67. P. 198–215.
19. Dulermo R., Brunel F., Dulermo T., et al. Using a vector pool containing variable-strength promoters to optimize protein production in *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell Fact.* 2017. V. 16. № 31. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0647-3>
20. Wong L., Engel J., Jin E., Holdridge B., Xu P. YaliBricks, a versatile genetic toolkit for streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng. Comm.* 2017. V. 5. P. 68–77.
21. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Melkina O.E., et al. A DNA assembly toolkit to unlock the CRISPR/Cas9 potential for metabolic engineering. *Commun. Biol.* 2023. V. 6. № 1. P. 858. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05202-5>
22. Taratynova, M.O., Fediayeva, I.M., Dementiev, D.A. et al. New pAraDH2 Promoter for Metabolic Engineering of the *Yarrowia lipolytica* Yeast. *Biochem. Microbiol.* 2023. V. 59. P. 1157–1167.
23. Zhang X.K., Wang D.N., Chen J., et al. Metabolic engineering of  $\beta$ -carotene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. letters.* 2020. V. 42. № 6. P. 945–956. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02844-x>
24. Ma Y., Liu N., Greisen P., et al. Removal of lycopene substrate inhibition enables high carotenoid productivity in *Yarrowia lipolytica*. *Nat. Comm.* 2022. V. 13. № 1. P. 572. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28277-w>
25. Zhou T., Park Y.K., Fu J., et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for the production and secretion of the saffron ingredient crocetin. *Biotechnol. Biofuel. Bioprod.* 2025. V. 18. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02598-y>
26. Lee H., Song J., Seo S.W.J. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the production of  $\beta$ -carotene by carbon and redox rebalancing. *Biol. Eng.* 2025. V. 19. № 6. <https://doi.org/10.1186/s13036-025-00476-1>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Черенкова Анна Андреевна — аспирант, лаборант-исследователь, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация  
E-mail: anncheren@gmail.com

Таратынова Мария Олеговна — к.б.н., научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация  
E-mail: mtaratynova@inbox.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-8662-3035>

Мелькина Ольга Евгеньевна — к.б.н., старший научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация  
E-mail: compleanno@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-7507-4827>

Поступила в редакцию 24.08.2025

После доработки 14.09.2025

Принята к публикации 29.09.2025

ABOUT THE AUTHORS

Cherenkova, Anna A. — graduate student, research assistant, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation  
E-mail: anncheren@gmail.com

Taratynova, Maria O. — Ph.D., researcher, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation  
E-mail: mtaratynova@inbox.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-8662-3035>

Melkina, Olga E. — Ph.D., senior researcher, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation  
E-mail: compleanno@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-7507-4827>

Received August 24, 2025

Revised September 14, 2025

Accepted September 29, 2025