



УДК 543.51+543.64

І. В. Драговоз, Н. О. Леонова, Л. Б. Зелена, А. В. Ребрієв,
Л. В. Авдєєва

Ідентифікація екзометаболітів штаму *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404 з антифунгальною активністю

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Г. О. Іутинською)

Проведено ідентифікацію екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404, що обумовлюють його антифунгальну активність. З використанням MALDI-TOF мас-спектрометрії і молекулярно-генетичних методів аналізу показано, що ліпопептидні антибіотики досліджуваного штаму належать до родини фенгіцинів.

Ключові слова: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, MALDI-TOF мас-спектрометрія, молекулярно-генетичний аналіз, фенгіцини.

Одними з найбільш вивчених і широко застосовуваних у даний час є ризобактерії роду *Bacillus*, 4–5% активного геному яких бере участь у синтезі антибіотичних сполук. Бацили здатні до синтезу більш ніж 25 структурно різноманітних антимікробних сполук [1]. Серед цих екзометаболітів циклічні ліпопептиди трьох родин (сурфактини, ітурини та фенгіцини) досить ґрунтовно досліджені, а деякі з них активно використовуються в сучасній біотехнології і фармацевтиці завдяки їх сурфактантним (поверхнево-активним) та гемолітичним властивостям. При цьому перевага надається певним групам циклоліпопептидів залежно від виду бацил та екологічної ніші їх існування. Як відомо з літературних джерел, до родини фенгіцинів (пліпастатинів) відносять ліпопептиди з внутрішнім лактонним кільцем у пептидній частині та з жирнокислотним β-гідроксиланцюгом (C14–C18), що може бути насиченим або ненасиченим [2]. Показано, що фенгіцини виявляють високу фунгітоксичну активність, особливо проти міцеліальних грибів [3]. Порівняно з іншими родинами циклоліпопептидних антибіотиків механізм дії фенгіцинів досліджено недостатньо, хоча відомо, що вони активно взаємодіють з ліпідними шарами, викликаючи зміну структури і проникності мембран [4]. Також відомо, що ліпопептиди родини фенгіцинів діють за синергетичним типом, досягаючи високої ефективності в комбінації з ітуринами або сурфактинами [5]. Синтез фенгіцинів притаманний таким видам, як *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*

© І. В. Драговоз, Н. О. Леонова, Л. Б. Зелена, А. В. Ребрієв, Л. В. Авдєєва, 2015

і *B. amyloliquefaciens* [5, 6]. Раніше нами було показано порівняно високу антифунгальну активність штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 щодо фітопатогенів зернових культур та проведено очищення і певний аналіз природи антибіотичних екзометаболітів штаму, що обумовлюють його антагоністичну активність.

У зв'язку з цим мета дослідження полягала в ідентифікації ліпопептидних антибіотичних екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404 із залученням мас-спектрометричного та молекулярно-генетичного методів аналізу.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктом досліджень був штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404 з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Культивування штаму проводили періодичним способом у колбах ємністю 750 мл на качалці (220 об/хв) при +28 °С протягом 18–24 год у рідкому поживному синтетичному середовищі такого складу, г/л: KH_2PO_4 — 9,63; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75; Na -цитрат $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 1,29; глюкоза — 15,0; вода дистильована — 1 л; рН 7,0–7,2. Як посівний матеріал використовували культуру бацил в експоненційній фазі росту (18 год). Кількість посівного матеріалу становила 5% (за об'ємом). Рідку культуру штаму IMB B-7404 в експоненційній фазі росту центрифугували 30 хв при 10 000 об/хв і температурі +4 °С. Загальну фракцію ліпопептидних антибіотичних екзометаболітів отримували з надосадової рідини трикратною екстракцією водонасиченим *n*-бутанолом за методикою BEMS (butanol extraction and methanol substitution) К. Йокота та ін. [7]. Після центрифугування при 10 000 об/хв впродовж 2 хв при +20 °С об'єднані *n*-бутанольні екстракти випарювали до сухого залишку в умовах низького тиску при 40–45 °С. Сухий залишок розчиняли в 5 мл метанолу, метанольний екстракт використовували в подальшій роботі як джерело ліпопептидних антибіотичних сполук.

Мас-спектрометричний аналіз ліпопептидної фракції екзометаболітів *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404 здійснювали на MALDI-TOF мас-спектрометрі Voyager DE PRO (“Applied Biosystems”, США). Точність вимірювання мас була на рівні 0,01%, вимірювання проводили в діапазоні m/z 500–1500. Застосовували H^+ -матричну іонізацію за допомогою альфа-ціано-4-гідроксикоричної кислоти (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA) (“Sigma-Aldrich”, США). Прилад калібрували з використанням калібрувальної суміші CalMix2 (“Applied Biosystems”, США). Матричний реагент готували, розчиняючи CHCA (10 мг/мл) у суміші рівних об'ємів ацетонітрилу та 0,2%-го водного розчину трифтороцтової кислоти (“Sigma-Aldrich”, США). Для нанесення брали суміш розчинів досліджуваного зразка (0,8 мкл) і розчину матриці (1 мкл). Використовували рефлектронний режим роботи часоперелітного детектора, прикладена напруга становила 20 кВ, час затримки екстракції іонів — 350 нс. Спектри обробляли за допомогою програми Data Explorer 4,0 (“Applied Biosystems”, США). Вимірювали моноізотопні значення протонуваних молекул, для усереднення використовували дані 80–100 спектрів. Молекулярну масу речовини визначали відніманням 1 (маса протона 1,007 Да) або 23 (маса іона Na^+ 23,989) від отриманого значення m/z .

Тотальну ДНК виділяли з добової культури клітин штаму IMB B-7404 та *B. subtilis* IMB B-7243 з використанням набору ДНК-сорб В (“АмпліСенс”, Росія) згідно з рекомендаціями виробника. Склад реакційної суміші і умови проведення ампліфікації з праймерами до генів синтезу фенгіцину наведені в роботі [8]. Послідовності праймерів до трьох генів синтезу фенгіцину (*fenA*, *fenD*, *fenE*) підібрані за допомогою програми Primer3 на основі нуклеотидних послідовностей цих генів, наведених у базі даних GenBank, а також KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) для видів роду *Bacillus*.

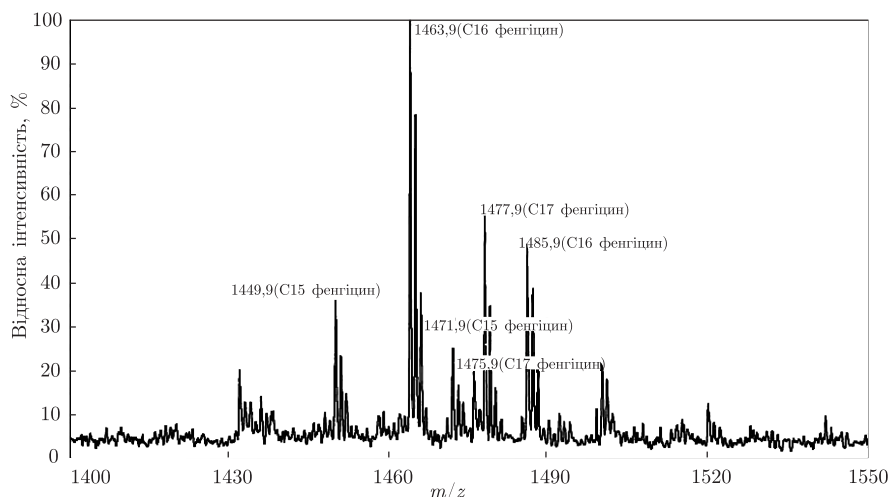


Рис. 1. MALDI-TOF мас-спектри фракції ліпопептидних екзометаболітів *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404

Для виділення сумарної РНК з добової культури бактеріальних клітин штамів IMB B-7404 та *B. subtilis* IMB B-7243 використовували набір Trizol RNA Prep (“Neogene”, Україна) з подальшою обробкою ДНКазою I (“Fermentas”, Литва). кДНК синтезували з 1 мкг РНК за допомогою набору GenPak® MasterMixCore (“Neogene”, Україна). ПЛР ампліфікацію в режимі реального часу проводили на приладі qTower 2.2 thermal cycler (Analytik Jena AG, Німеччина) за умов, наведених у роботі [9]. Для порівняння відносної експресії генів фенгіциносинтетази використовували сумарну РНК, отриману зі штаму *B. subtilis* IMB B-7243. Розрахунок відносного рівня експресії гена проводили за методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [10]. Як ендогенний контроль приймали експресію гена 16S рРНК [9].

Результати та їх обговорення. Показано, що для різних гомологів фенгіцину піки, що відповідають цим сполукам, в MALDI-TOF мас-спектрі знаходяться в діапазоні від 1449,8 до 1499,9 m/z (табл. 1). У табл. 1 наведені експериментально отримані значення m/z піків ліпопептидів родини фенгіцинів, що були виявлені при аналізі MALDI-TOF мас-спектрів (рис. 1).

Основні піки при m/z в області від 1449,9 до 1499,9 можуть бути приналежними до ізоформ фенгіцинів, що містять жирну β -гідроксикислоту з довжиною вуглецевого ланцюга

Таблиця 1. Відповідність MALDI-TOF мас-піків до фенгіцинів [11]

Основні MALDI-TOF MS піки (m/z)	Відповідність	Кількість подвійних зв'язків у молекулі	Амінокислота ліпопептиду в положенні 6
1449,8	C15 фенгіцин, [M+H] ⁺	0	Ala
1463,8	C16 фенгіцин, [M+H] ⁺	0	Ala
1471,8	C15 фенгіцин, [M+Na] ⁺	0	Ala
1475,8	C17 фенгіцин, [M+H] ⁺	1	Ala
1477,8	C17 фенгіцин, [M+H] ⁺	0	Ala
1485,8	C16 фенгіцин, [M+Na] ⁺	0	Ala
1491,8	C16 фенгіцин, [M+H] ⁺	0	Val
1499,9	C17 фенгіцин, [M+Na] ⁺	0	Ala

від 15 до 17 атомів. У випадку, коли $m/z = 1475,8$, має місце наявність подвійного зв'язку в структурі жирнокислотного ланцюга, що містить 17 атомів вуглецю (див. табл. 1). Також С16 фенгіцин ($m/z = 1491,8$), що відповідає протонуваній ізоформі, може бути з'єднаним у положенні 6 з амінокислотою валіном, тоді як у решти ізоформ в положенні 6 може знаходитись амінокислота аланін [11].

Враховуючи складність щодо характеристики та ідентифікації ліпопептидних антибіотиків бактерій роду *Bacillus*, використання для цих цілей MALDI-TOF мас-спектрометричного аналізу, поряд з іншими фізико-хімічними методами, є досить інформативним і широко застосовується. Так, Й. Ватером із співавт. запропоновано інноваційний метод MALDI-TOF мас-спектрометричного аналізу ліпопептидних біосурфактантів у вегетативних клітинах та культуральному фільтраті *B. subtilis* С-1, виділеної з нафтового відстійника [12]. При дослідженні ролі ліпопептидних антибіотиків родини ітуринів і фенгіцинів у прояві антагонізму певних штамів *B. subtilis* для характеристики та ідентифікації антибіотичних ліпопептидів також було застосовано MALDI-TOF мас-спектрометричний аналіз поряд з іншими методами якісного аналізу (RP-HPLC, ESI-MS) [6]. Доцільність підготовки зразків до мас-спектрометричного аналізу, що включала кінцеве очищення ліпопептидвмісних фракцій методом RP-HPLC на С18 колонках, підтверджується даними літератури [13].

Наступним етапом характеристики та ідентифікації позаклітинних ліпопептидних антибіотиків штаму ІМВ В-7404 було проведення молекулярно-генетичних досліджень, що включають в себе ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів та порівняльний кількісний аналіз активності генів фенгіцинсинтез.

Відомо, що до складу оперону, відповідального за синтез фенгіцинів, входить п'ять генів фенгіцинсинтез (*fenC*, *fenD*, *fenE*, *fenA* і *fenB*), що беруть участь у нерибосомальному синтезі циклоліпопептидів [14]. За результатами досліджень структури та функціональної організації мультиензимного комплексу фенгіцинсинтез у деяких видів роду *Bacillus* встановлено, що ці ферменти містять від одного до декількох модулів, що активують певну амінокислоту в процесі синтезу фенгіцинів. До складу кожного модуля входять домени, що відповідають за розпізнавання та включення амінокислоти в пептид (домен А), її сприйняття і просування ланцюга між каталітичними центрами (домен Т), формування пептидного зв'язку між амінокислотами (домен С). На С-кінці чотирьох синтез розташований домен Е, а *fenB* містить ТЕ-домен, що завершує синтез пептиду. Пошкодження або делеція будь-якого з генів призводить до припинення синтезу пептиду [3].

Для виявлення бактерій — потенційних продуцентів ліпопептидних антибіотиків, зокрема фенгіцинів, було запропоновано використовувати ДНК-маркери, зокрема, до гена *fenD* [15]. З цією метою нами була проведена ампліфікація зі специфічними праймерами до трьох генів фенгіцинсинтез, у результаті чого виявлено наявність цих генів у геномі *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7404. Про це свідчили отримані продукти ампліфікації розрахованої довжини: 286 (*fenA*), 132 (*fenD*), 168 (*fenE*) п. н. (рис. 2)

Згідно з результатами порівняльного кількісного аналізу активності трьох генів фенгіцинсинтез у двох видів бацил, що входять до складу бінарної композиції для обробки зернових культур проти грибкових хвороб, штам *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7404 характеризувався нижчим у 1,5 та 27 разів рівнем експресії генів *fenA* і *fenD* відповідно; транскрипційна активність гена *fenE* у 4,3 раза перевищувала цей показник у *B. subtilis* ІМВ В-7243 (рис. 3). Загалом встановлено, що сумарна транскрипційна активність трьох генів фенгіцинового оперону виявилася вищою в 4,7 раза у *B. subtilis* ІМВ В-7243 порівняно з аналогічним показником *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7404.

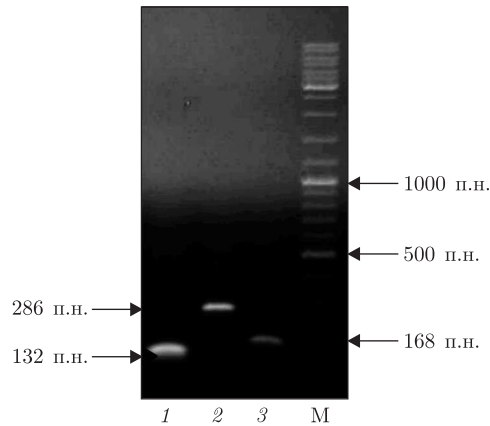


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до генів фенгіцинсинтез — *fenD* (1), *fenA* (2), *fenE* (3): М — маркер молекулярної маси GeneRuler DNA Ladder Mix (“Fermentas”, Литва)

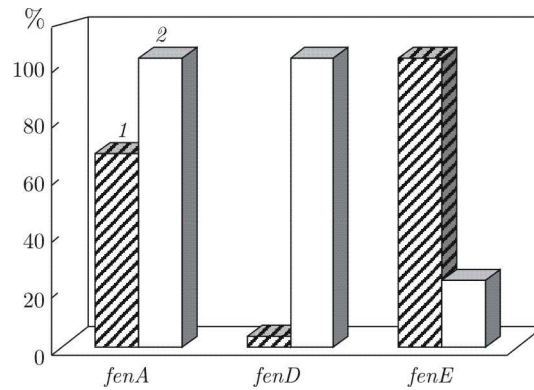


Рис. 3. Діаграма відносної експресії генів фенгіцинсинтез (*fenA*, *fenD*, *fenE*) у *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7404 (1) та *B. subtilis* ІМВ В-7243 (2). За 100% приймали найвищий рівень експресії гена. Встановлені відмінності в експресії генів є статистично достовірними за рівнем значущості не більше 5% ($p < 0,05$)

Таким чином, результати ПЛР-аналізу зі специфічними праймерами до трьох генів фенгіцинсинтез (*fenA*, *fenE*, *fenD*) свідчать про наявність цих генів у геномі *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7404. За даними порівняльного кількісного аналізу транскрипційної активності генів фенгіцинсинтез більш високий рівень експресії вказаних генів виявлено у штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243 порівняно з *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7404.

Отже, із застосуванням MALDI-TOF мас-спектрометричного і молекулярно-генетичних методів аналізу встановлено, що циклічні ліпопептидні антибіотики штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7404 належать до родини фенгіцинів. Подальші дослідження можливої ролі фенгіцинів у біологічному контролі рослинних хвороб пов'язані з вивченням їх впливу на індукцію системної стійкості рослин, про що свідчать літературні джерела [5].

Цитована література

1. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Mol. Microbiol. – 2005. – 56, Iss. 4. – P. 845–857.

2. *Ongena M., Jacques Ph.* Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol // Trends Microbiol. – 2008. – **16**, No 3. – P. 115–125.
3. *Koumoutsis A., Chen X.-H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R.* Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 // J. Bacteriol. – 2004. – **186**. – P. 1084–1096.
4. *Deleu M., Paquot M., Nylander T.* Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface – implications for the effect of fengycin on biological membranes // J. Colloid Interface Sci. – 2005. – **283**, No 2. – P. 358–365.
5. *Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. L., Thonart P.* Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants // Environ. Microbiol. – 2007. – **9**. – P. 1084–1090.
6. *Romero D., De Vicente A., Rakotoaly R. H., Dufour S. E., Veening J. W., Arrebola E., Cazorla F. M., Kuipers O. P., Paquot M., Péres-Garsia A.* The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca* // Mol. Plant Microbe Interact. – 2007. – **20**, No 4. – P. 430–440.
7. *Yokota K., Yatsuda M., Miwa E., Higuchi K.* Comparative study on sample preparation methods for the HPLC quantification of iturin from culture supernatant of an antagonistic *Bacillus* strain // J. ISSAAS. – 2012. – **18**, No 1. – P. 70–75.
8. *Клочко В. В., Зелена Л. Б., Чугунова К. О., Авдеева Л. В.* Аналіз феназинового комплексу штамів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 // IX з'їзд УТГіС “Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології”, Алушта, 24–28 вересня 2012 р. – Т. 4. – С. 358–362.
9. *Zelena L., Gretskey I., Gromozova E.* Influence of ultrahigh frequency irradiation on *Photobacterium phosphoreum luxB* gene expression // Central Europ. J. Biol. – 2014. – **9**. – P. 1004–1010.
10. *Livak K. J., Schmittgen T. D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method // Methods. – 2001. – **25**, No 4. – P. 402–408.
11. *Wei Y.-H., Wang L.-C., Chen W.-C., Chen S.-Y.* Production and characterization of fengycin by indigenous *Bacillus subtilis* F29–3 originating from a potato farm // Int. J. Mol. Sci. – 2010. – **11**. – P. 4526–4538.
12. *Vater J., Kablitz B., Wilde C., Franke P., Mehta N., Cameotra S. S.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – **68**, No 12. – P. 6210–6219.
13. *Ongena M., Jacques P., Touré Y., Destain J., Jabrane A., Thonart P.* Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **69**, Iss. 1. – P. 29–38.
14. *Wu C.-Y., Chen C.-L., Lee Y.-H., Cheng Y.-C., Wu Y.-C., Shu H.-Y., Götz F., Liu S.-T.* Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**. – P. 5608–5616.
15. *Ramarathnam R., Bo S., Chen Y., Fernando W. G. D., Xuewen G., de Kievit T.* Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D-producing *Bacillus spp.*, antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat // Can. J. Microbiol. – 2007. – **53**. – P. 901–911.

References

1. *Stein T.* Mol. Microbiol., 2005, **56**, Iss. 4: 845–857.
2. *Ongena M., Jacques Ph.* Trends Microbiol., 2008, **16**, N 3: 115–125.
3. *Koumoutsis A., Chen X.-H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R.* J. Bacteriol., 2004, **186**: 1084–1096.
4. *Deleu M., Paquot M., Nylander T.* J. Colloid Interface Sci., 2005, **283**, No 2: 358–365.
5. *Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. L., Thonart P.* Environ. Microbiol., 2007, **9**: 1084–1090.
6. *Romero D., De Vicente A., Rakotoaly R. H., Dufour S. E., Veening J. W., Arrebola E., Cazorla F. M., Kuipers O. P., Paquot M., Péres-Garsia A.* Mol. Plant Microbe Interact., 2007, **20**, No 4: 430–440.
7. *Yokota K., Yatsuda M., Miwa E., Higuchi K.* J. ISSAAS, 2012, **18**, No 1: 70–75.
8. *Klochko V. V., Zelena L. B., Chugunova K. O., Avdeeva L. V.* Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology, 2012, Vol. 4: 358–362 (in Ukrainian)

9. Zelena L., Gretskey I., Gromozova E. Central Europ. J. Biol., 2014, **9**: 1004–1010.
10. Livak K. J., Schmittgen T. D. Methods, 2001, **25**, No 4: 402–408.
11. Wei Y.-H., Wang L.-C., Chen W.-C., Chen S.-Y. Int. J. Mol. Sci., 2010, **11**: 4526–4538.
12. Vater J., Kablitz B., Wilde C., Franke P., Mehta N., Cameotra S. S. Appl. Environ. Microbiol., 2002, **68**, No 12: 6210–6219.
13. Ongena M., Jacques P., Touré Y., Destain J., Jabrane A., Thonart P. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005, **69**, Iss. 1: 29–38.
14. Wu C.-Y., Chen C.-L., Lee Y.-H., Cheng Y.-C., Wu Y.-C., Shu H.-Y., Götz F., Liu S.-T. J. Biol. Chem., 2007, **282**: 5608–5616.
15. Ramarathnam R., Bo S., Chen Y., Fernando W. G. D., Xuewen G., de Kievit T. Can. J. Microbiol., 2007, **53**: 901–911.

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 05.03.2015

И. В. Драговоз, Н. О. Леонова, Л. В. Зеленая, А. В. Ребриев, Л. В. Авдеева

Идентификация экзометаболитов штамма *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ИМВ В-7404 с антифунгальной активностью

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ
Інститут біохімії ім. А. В. Палладіна НАН України, Київ

*Проведена ідентифікація екзометаболитів штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ИМВ В-7404, обумовлюючих його антифунгальну активність. С використанням MALDI-TOF мас-спектрометрії і молекулярно-генетических методів аналізу показано, що ліпопептидні антибіотики досліджуваного штамма належать до родини фенгіцинів.*

Ключевые слова: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, MALDI-TOF мас-спектрометрія, молекулярно-генетический аналіз, фенгіцини.

I. V. Dragovoz, N. O. Leonova, L. V. Zelena, A. V. Rebriyev, L. V. Avdeeva

Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7404 strain exometabolites with antifungal activity

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev
Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

*Identification of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7404 strain exometabolites causing its antifungal activity has been determined. Using the MALDI-TOF mass spectrometry and molecular genetic methods of analysis, it is shown that lipopeptide antibiotics of the researched strain are related to the family of fengycins.*

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, MALDI-TOF mass spectrometry, molecular genetic analysis, fengycins.