

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Луниной Юлии Николаевны «Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого растительного сырья», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации Ю.Н. Луниной «Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого растительного сырья» на соискание ученой степени кандидата биологических наук посвящен разработке способов получения штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) с повышенным синтезом лимонной кислоты (ЛК), а также методов селекции высокопродуктивных штаммов и использованию различных возобновляемых источников углерода для синтеза ЛК полученными штаммами. ЛК – мощный антиоксидант, который широко применяется при производстве продуктов питания, напитков, десертов, в качестве подкислителя и природного консерванта, в медицине и при получении различных косметических средств. На данный момент ЛК получают с помощью селекционных штаммов плесневых грибов *Aspergillus niger*, а в качестве субстратов используют сахарозу. Однако с каждым годом возрастает потребность в ЛК и появляется необходимость получения ЛК в больших объемах с минимальными затратами. Получение ЛК микробиологическим способом из возобновляемого сырья позволит снизить затраты на источник углерода для штаммов микроорганизмов и получить высокий выход целевого продукта. Таким образом, исследования Луниной Ю.Н. несомненно актуальны и соответствуют основным задачам биотехнологии.

В ходе проделанной работы была исследована способность 34 природных штаммов дрожжей, принадлежащих к родам *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и *Yarrowia* (ранее *Candida*) синтезировать лимонные кислоты (ЛК и ИЛК) из глюкозы. Отобран штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373, который обладал наибольшей продукцией ЛК (17,6 г/л). На следующем этапе были подобраны условия культивирования данного штамма для получения максимального количества ЛК: pH=4,0-6,0, концентрация глюкозы в среде не выше 40 г/л и интенсивная аэрация не требуется (аэрация 0,24-0,33 ммоль). Оптимизация условий культивирования привела к увеличению биосинтеза *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 ЛК в 2 раза. Далее диссертант предпринял попытку увеличить продуктивность природного штамма с помощью воздействия физическими и химическими факторами. Для получения мутантных штаммов использовали обработку *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 ультрафиолетовым облучением (УФ) и *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидином (НГ), а также их комбинированное воздействие. Данные манипуляции привели к получению огромного количества мутантных штаммов, из которых с помощью разработанных автором методов селекции, был выбран мутант №15. Мутант № 15 был получен в результате обработки природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 мутагеном НГ (40 мкг/мл) и последующим УФ-облучением в течение 5 мин. На 192 ч мутант №15 накапливает 100 г/л ЛК и 4,3 г/л ИЛК,  $Y_{ЛК}$  составляет 70% от потребленной глюкозы, в то время как природный штамм синтезирует - 80 г/л ЛК. Характеристики полученного штамма соответствуют значениям, известным для продуцентов ЛК плесневыми грибами. Кроме того, автором разработаны условия для культивирования мутантного штамма в мембранном биореакторе, что позволяет увеличить продолжительность микробиологического процесса получения ЛК. Еще одной важной заслугой автора является использование в качестве источника углерода различных возобновляемых субстратов: рапсового масла, ферментолизата опилок осины. Показано, что биомасса полученного штамма богата легкоусваиваемыми аминокислотами и может быть использована в качестве пищевой добавки для домашнего скота.

Автором созданы мутанты *Y.lipolytica*, обладающие повышенной способностью к синтезу ЛК из возобновляемого растительного сырья (глюкозы, рапсового масла, глюкозо-содержащих ферментализатов). Разработана схема для быстрого отбора мутантов с помощью селективных сред с ацетатом и цитратом на первом этапе отбора, а также качественные экспресс-методы оценки кислотообразования по зонам растворения мела и в жидкой среде с дефицитом азота. Подобраны условия для культивирования в ферментере мутанта *Y. lipolytica* № 15. Использование мутанта *Y. lipolytica* №15 в условиях периодического культивирования привело к концентрации ЛК 100 г/л в среде с глюкозой и 175 г/л в среде с рапсовым маслом, что достаточно для реализации в промышленном масштабе. Процесс получения ЛК из рапсового масла воспроизведен в полупромышленных масштабах на Опытно-технологической установке ИБФМ РАН. Показано, что высокопродуктивный мутант *Y. lipolytica* №15, отличается устойчивостью к синтезу ЛК в течение длительного культивирования в режиме отъемов-доливов (1280 ч), концентрация ЛК составляла 65-70 г/л; и с применением мембранного модуля (480 ч), концентрация ЛК составила 25-40 г/л. Впервые была показана возможность получения ЛК и биомассы, обогащенной протеином и незаменимыми аминокислотами из глюкозо-содержащих отходов ферментализата опилок осины.

В работе использовались адекватные современные микробиологические методы, биохимические методы определения количества вещества и ферментативной активности. Несомненным достоинством представленной работы является адаптация полученных результатов для промышленного производства. Работа проведена четко, кропотливо и последовательно.

Результаты работы Луниной Ю.Н. опубликованы в 5 российских и зарубежных журналах, представлены на множестве конференций. По итогам проделанной работы сделаны четкие выводы, соответствующие поставленным задачам исследования.

По актуальности поставленных задач, научной новизне, практической значимости и объему проведенных исследований диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения научных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Кандидат биологических наук,

Научный сотрудник группы лесной биотехнологии

Ковалицкая Ю.А.

1.02.2016



Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

142290 Московская область, г. Пущино, пр-т Науки, д.6.

E-mail: kovalitskaya@inbox.ru

Телефоны: (4997) 33 09 66