

ОТЗЫВ

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

Известно, что лимонная кислота (ЛК) широко используется в пищевой, фармацевтической и других видах промышленности, а также в сельском хозяйстве. Химический способ синтеза ЛК экономически нецелесообразен из-за высокой себестоимости. В настоящее время лимонную кислоту получают в основном биотехнологическим способом, используя различные микроорганизмы, в том числе и дрожжи. При использовании диких штаммов дрожжей помимо ЛК в больших количествах синтезируется побочный продукт – изолимонная кислота. Актуальность диссертационной работы Ю.Н. Луниной состоит в создании мутантных штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica*, которые при росте на средах с различными возобновляемыми источниками углерода могли бы стать высокоэффективными продуцентами ЛК.

Диссертационная работа написана и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям: она изложена на 128 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, раздела, включающего описание материалов и методов исследования, экспериментальной части, состоящей из 9 глав, заключения, выводов и списка сокращений. Список цитируемой литературы включает 203 наименования. Диссертационная работа хорошо иллюстрирована, содержит 27 таблиц и 21 рисунок.

Во введении Ю.Н. Лунина обосновала актуальность, научную новизну и практическую значимость данного исследования, четко сформулировала цели и задачи. Обзор литературы имеет непосредственное отношение к теме

диссертации, он посвящен современному состоянию исследований в области изучения биосинтеза лимонной кислоты различными микроорганизмами, в том числе дрожжами. Обзор литературы состоит из нескольких разделов. В начале обзора рассмотрены перспективы микробиологического синтеза органических кислот. Затем приведена характеристика ЛК и области ее применения. Далее автором подробно анализируются известные микроорганизмы-продуценты и способы получения ЛК. Особое внимание уделено синтезу ЛК дрожжами из различных субстратов. Ю.Н. Луниной детально описаны способы отбора наиболее продуктивных штаммов микроорганизмов с помощью мутагенеза. Отдельные главы обзора литературы посвящены описанию условий биосинтеза ЛК дрожжами *Yarrowia lipolytica*, а также рассмотрению механизма ее биосинтеза. В обзоре отмечено, что для создания эффективного процесса получения ЛК имеются широкие возможности использования таких доступных и дешевых субстратов, как глюкоза, растительные масла и глюкозосодержащие сиропы. Обзор литературы убеждает в глубоком понимании Ю.Н. Луниной как предыстории проблемы, так и современного ее состояния и подтверждает правомерность постановки задач и определения путей их решения. В целом обзор литературы является теоретическим обоснованием для выбора стратегии собственных исследований автора работы.

Материалы и методы изложены четко и подробно описаны. Автором использован широкий спектр современных методов микробиологии, биотехнологии и биохимии. Эти методы применены для создания мутантных штаммов *Y. lipolytica* и для изучения биосинтеза ЛК с использованием различных субстратов. В работе используются различные методы культивирования дрожжей – периодическое, отъемно-доливное и непрерывное. Полученные мутанты *Y. lipolytica* охарактеризованы с помощью спектрофотометрических, хроматографических и биохимических методов. Применение разных подходов, несомненно, делает результаты

работы надежными и достоверными. Статистический анализ проведен корректно. Основные научные положения диссертации и выводы обоснованы и логично вытекают из полученных экспериментальных данных.

Экспериментальная часть диссертации Ю.Н. Луниной состоит из нескольких частей. Вначале автором была изучена способность 34 различных штаммов дрожжей к синтезу лимонных кислот из глюкозы. Для дальнейшей работы в качестве продуцента отобран штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373, обладающий наилучшими характеристиками. Ю.Н. Луниной оптимизированы условия культивирования данного штамма, что намного повысило синтез ЛК. Однако для промышленного синтеза ЛК желательна высокая концентрация продукта (не менее 100 г/л). В связи с этим были предприняты эксперименты по получению мутантных штаммов дрожжей, обладающих способностью к повышенному синтезу ЛК.

Для получения мутантов Ю.Н. Лунина использовала ультрафиолетовое облучение и мутаген N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ). Автором разработаны экспресс-тесты для отбора мутантов с нужными характеристиками. Первоначально мутанты отбирались на средах с ацетатом или цитратом. Предполагалось, что снижение скорости роста на этих средах свидетельствует о нарушениях в цикле трикарбоновых кислот, что может привести к повышенному синтезу ЛК. Далее полученные мутантные штаммы анализировали на средах с мелом, а также с бромкрезоловым зеленым. В результате скрининга отобраны штаммы с наибольшим кислотообразованием. Эти мутанты протестированы на биосинтез ЛК и ИЛК. Оказалось, что три полученных мутанта из восьми обладали лучшими характеристиками по сравнению с исходным штаммом *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373. Далее полученные мутанты подвергли повторной перекрестной обработке мутагенами. Комбинированный мутагенез увеличил продуктивность биосинтеза ЛК из глюкозы на 20% по сравнению с исходным штаммом. В дальнейших исследованиях Ю.Н. Луниной использовался

двойной мутант *Y. lipolytica* №15. Этот мутант охарактеризован по культурально-морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам и депонирован в ВКМ.

В следующих главах диссертации описываются эксперименты по подбору условий культивирования мутантов, обеспечивающих продолжительный и стабильный синтез ЛК. Вначале протестировано культивирование в мембранном реакторе на среде с глюкозой и минимальным количеством азота. Однако интенсивный синтез ЛК (до 40 г/л) наблюдался только в течение 300 ч, а затем снижался. Более перспективным оказался отъемно-доливной метод культивирования, при котором в ферментере через определенные промежутки времени часть культуральной жидкости замещалась свежей питательной средой. Ю.Н. Луниной подобраны условия культивирования дрожжей, при которых процесс биосинтеза происходил интенсивно в течение 53 суток, а концентрация ЛК достигала 70 г/л.

В дальнейших экспериментах продемонстрирована возможность биосинтеза ЛК мутантными дрожжами при росте на других возобновляемых субстратах – рапсовом масле и ферментоллизате из опилок осины. Показана высокая биосинтетическая активность мутанта №15 (до 175 г/л ЛК) по сравнению с исходным штаммом и мутантом, ранее полученным в лаборатории, при выращивании дрожжей в среде с добавлением рапсового масла. При этом автором проанализирована активность ферментов начальных этапов метаболизма масла и цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Предполагается, что при росте на рапсовом масле в клетках дрожжей наряду с ЦТК активно работает глиоксилатный цикл, дополнительно участвующий в синтезе ЛК.

Ю.Н. Луниной впервые установлено, что в качестве возобновляемого субстрата для выращивания дрожжей-продуцентов ЛК можно использовать отходы деревоперерабатывающего производства. Однако выход лимонной

кислоты был небольшим из-за наличия неусвояемых сахаров в ферментализате опилок осины. Автором изучена возможность использования биомассы дрожжей в качестве кормовой добавки. Показано, что в белке, выделенном из клеток дрожжей, есть все необходимые аминокислоты, хотя и в меньших количествах, чем, например, в соевом белке. Полученные данные представляют интерес для практического использования дрожжей в сельском хозяйстве, поскольку биомасса дрожжей хорошо переваривается животными.

Новизна и актуальность данного диссертационного исследования не вызывают сомнения, поскольку Ю.Н. Луниной созданы и охарактеризованы мутантные штаммы дрожжей *Y. lipolytica*, которые в дальнейшем могут послужить продуцентами лимонной кислоты. Следует отметить, что диссертация хорошо оформлена, имеет большое количество иллюстративного материала.

Есть несколько замечаний по диссертации:

1. Список сокращений и обозначений нужно давать в алфавитном порядке. Неплохо было бы привести список сокращений и в автореферате.
2. Для мутагена N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина дано неправильное сокращение – НГ вместо МННГ.
3. Есть замечание по выводам диссертации. В выводах 1 и 2 отмечается, что отобраны мутанты с более высокой биосинтетической активностью, но не написано, что за вещество эти мутанты синтезировали. Надо было написать, что эти мутанты отличались более высоким синтезом лимонной кислоты.
4. Имеется ряд опечаток, некоторые стилиевые погрешности

Все эти замечания в своем большинстве носят рекомендательный характер и не умаляют значения полученных результатов.

При прочтении работы возникли вопросы, ответы на которые хотелось бы услышать от автора.

1. В «Методах» диссертации написано «При периодическом, отъемно-доливном и непрерывном способах культивирования *Y. lipolytica* № 15 в качестве источника микроэлементов использовали водопроводную воду». Воспроизводимы ли при этом результаты культивирования дрожжей?
2. Весьма перспективным представляется использование в биотехнологии полученного в данном исследовании мутанта дрожжей *Yarrowia lipolytica* №15. Этот мутант получен с использованием ультрафиолетового облучения и мутагена МННГ. Современные методы создания мутантов предполагают использование сайт-направленного мутагенеза, а также получение рекомбинантных штаммов дрожжей с помощью генетической инженерии. Нельзя ли получить суперпродуценты ЛК с помощью введения в микроорганизмы (не только в клетки дрожжей) каких-либо генов? Имеются ли подобные работы в России и мире?
3. Насколько выгодно использовать в качестве субстрата ферментолитат осины, поскольку приходится применять целлюлазу, а выход лимонной кислоты низкий?

В целом, диссертационная работа Ю.Н. Луниной отличается новизной и научной значимостью полученных данных. Выводы подтверждены большим количеством экспериментов и их достоверность не вызывает сомнений. Материалы диссертации опубликованы в престижных зарубежных и российских журналах из списка ВАК и доложены на нескольких международных и отечественных конференциях. Автореферат полностью и адекватно отражает содержание диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Луниной Юлии Николаевны на тему «Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого растительного сырья» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей большое научное и практическое значение для современной биотехнологии. По актуальности темы, новизне, теоретической и практической значимости результатов работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор, Лунина Юлия Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Старший научный сотрудник
лаборатории биотехнологии растений
Филиала Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290 г. Пущино Московской обл.,
Проспект Науки, д. 6
доктор биологических наук
(03.01.03 – молекулярная биология)
E-mail: ruk@bibch.ru
Тел. 8-4967-33-09-70



Рукавцова Елена Борисовна

2 февраля 2016 г.