

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГУП

«Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»



Бебуров М.Ю.

3 февраля 2016 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации 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)

Диссертационная работа Ю.Н. Луниной посвящена разработке процессов получения лимонной кислоты из возобновляемого растительного сырья с помощью мутантных штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica*.

**Актуальность темы** исследования обусловлена использованием для разработки процессов получения лимонной кислоты возобновляемых источников углерода (древесных отходов, растительных масел). Лимонная кислота находит широкое применение в пищевой, химической и фармацевтической промышленности. В мире ежегодно производится более 1,5 млн. тонн лимонной кислоты и её солей.

Традиционная технология производства лимонной кислоты из мелассы с использованием грибов *Aspergillus niger*, имеет ограниченную сырьевую базу, является многостадийной и экологически небезопасной. В ИБФМ РАН разработаны процессы получения лимонной кислоты с использованием дрожжей *Yarrowia lipolytica* из *n*-алканов, этилового спирта, глицерина, глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива. Биосинтез лимонной кислоты из растительных масел и глюкозо-содержащих отходов древесины на момент начала диссертационной работы был изучен недостаточно.

Также актуальным является получение высокоактивных мутантных штаммов – продуцентов и изучение их физиолого-биохимических характеристик для создания научных основ для разработки процессов получения лимонной кислоты.

Работа выполнена в лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов в рамках утвержденных тем плановых научно-исследовательских работ ИБФМ РАН.

**Цель работы** заключалась в разработке процессов получения лимонной кислоты из возобновляемых источников углерода на основе специально-селекционированных мутантных штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Исследование было направлено на изучение биосинтеза лимонной кислоты при различных режимах культивирования (периодического с подпиткой, отъемно-доливного и с применением мембранного модуля

с использованием глюкозы, глюкозо-содержащих ферментализатов древесных отходов, рапсового масла.

Диссертация Ю.Н. Луниной построена по традиционному плану, изложена на 128 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 203 источника. В работу включены список сокращений и условных обозначений, 27 таблиц, 21 рисунок и 2 Приложения (Протокол о проведении процесса биосинтеза и приготовлении опытной партии лимонной кислоты из рапсового масла на базе Опытной технологической установки ИБФМ РАН и Свидетельство о депонировании мутантного штамма *Y. lipolytica* № 15 в ВКМ с присвоением регистрационного номера ВКМ Y-2997D).

**Введение** включает сведения об актуальности темы исследования, научной новизне и практической значимости работы. Во введении также обозначены цель и задачи исследования.

**Первая глава** содержит обзор литературы и анализ литературных данных по тематике исследования. В нём исчерпывающе полно суммированы сведения о перспективах переработки растительных отходов в России, существующих способах микробиологического получения органических кислот, областях применения лимонной кислоты, продуцентах, условиях и механизмах биосинтеза лимонной кислоты из разных источников углерода. Подробно описаны работы по биосинтезу лимонной кислоты в нашей стране, которые были начаты более 40 лет назад в ИБФМ РАН и продолжаются по настоящее время. На протяжении этого времени сотрудниками ИБФМ РАН проводились работы по биосинтезу цитрата натрия из n-алканов, глицерина и глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива, а также пищевой лимонной кислоты - из этанола. Также обсуждены работы по биосинтезу лимонной кислоты, проводимые зарубежом. Приведены имеющиеся в литературе сведения о традиционных способах получения лимонной кислоты с помощью грибов *Aspergillus niger*. Обзор литературы читается легко, с интересом; служит хорошим обоснованием выбора предмета исследования.

**Вторая глава** состоит из описания объектов исследования, методик экспериментов, аналитических методов. Методы изложены чётко и подробно описаны. Часть методических вопросов, касающихся получения и селекции мутантов, а также проведения процессов в режиме отъемов-доливов и проточное культивирование с мембранным модулем, вынесена автором в соответствующие разделы главы 3.

**Третья глава** содержит полученные результаты и их обсуждение. Глава состоит из девяти разделов, описывающих последовательность выполнения экспериментальных исследований.

Проведенная автором селекция природных штаммов дрожжей позволила диссертанту выявить перспективный для дальнейшей работы штамм-продуцент *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373.

В дальнейшем на основе селекционированного штамма методами физического и химического мутагенеза были созданы высокоактивные продуценты лимонной кислоты. Мутанты получали ультрафиолетовым облучением или обработкой нитрозогуанидином, а также их комбинированным воздействием. Селекция проводилась на оригинальных селективных средах с ацетатом или цитратом, агаризованных средах с мелом или бромкрезоловым зеленым и в жидкой среде. В результате скрининга колоний, обработанных мутагенами, было отобрано 6 мутантов, у которых биосинтез лимонной кислоты был на 20-40% выше по сравнению с исходным штаммом. Для дальнейшей работы был отобран мутантный штамм *Y. lipolytica* № 15, характеризующийся максимальной кислотобразующей способностью.

Для штамма *Y. lipolytica* № 15 были подобраны условия культивирования и исследованы механизмы кислотообразования. Данный штамм обладал высокой активностью цитрат-синтазы – фермента, ответственного за биосинтез лимонной кислоты, и пониженными активностями аконитат-гидратазы и НАД-зависимой изоцитрат-дегидрогеназы – ферментами, вовлеченными в дальнейшее превращение цитрата в клетке.

Диссертантом разработаны способы получения лимонной кислоты с помощью штамма-продуцента в условиях периодического культивирования, с использованием мембранного модуля и в режиме отъемов/доливов. При культивировании мутанта достигнуты высокие концентрации лимонной кислоты. Способ получения лимонной кислоты из рапсового масла апробирован в пилотных ферментерах объёмом 100 л, проведено выделение и очистка лимонной кислоты из культуральной жидкости.

Впервые показана возможность использования глюкозо-содержащих отходов древесины для получения лимонной кислоты с помощью дрожжей. Обнаружено, что при культивировании дрожжей на древесных ферментолизатах биомасса обогащена протеином и незаменимыми аминокислотами.

**Научная новизна исследования.** Для получения штаммов-продуцентов автором разработаны и применены эффективные методы отбора мутантов на селективных средах, повышающие частоту выявления мутантов на порядки. Селекционированы высокоактивные мутантные штаммы дрожжей *Y. lipolytica*, обладающие повышенной способностью к синтезу лимонной кислоты из возобновляемого растительного сырья. Впервые обнаружена способность дрожжей *Y. lipolytica* к сверхсинтезу лимонной кислоты из глюкозо-содержащих отходов древесины.

Созданы научные основы для разработки микробиологических способов получения лимонной кислоты из доступного и дешевого растительного сырья.

**Практическая значимость работы.** Были созданы новые мутантные штаммы дрожжей *Y. lipolytica*, способные к сверхсинтезу лимонной кислоты с использованием в качестве источника углерода и энергии возобновляемого растительного сырья (рапсового масла, глюкозо-содержащих отходов древесины). Разработанные методы культивирования позволяли получать лимонную кислоту на уровне 100 г/л в среде с глюкозой и 175 г/л в

среде с рапсовым маслом, что достаточно для реализации технологии в промышленном масштабе.

**Достоверность полученных результатов, степень обоснованности результатов и выводов.** Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела дополняют друг друга и логически развивают положения, установленные ранее. Исследование проведено на высоком методическом уровне, осуществлен большой объём экспериментальной работы. Достоверность полученных результатов обеспечивается квалифицированным применением комплекса биотехнологических, микробиологических и биохимических исследований, грамотной обработкой результатов. Результаты работы достоверны, выводы обоснованы. Все научные результаты, изложенные в диссертации, получены при личном участии автора.

#### **Некоторые замечания и комментарии к диссертации представлены ниже:**

1. В главе 1 достаточно полно представлены сведения о получении продуцентов лимонной кислоты с применением методов классической генетики. Вместе с тем не обсуждены имеющиеся в литературе данные о создании генно-модифицированных штаммов дрожжей – продуцентов лимонной кислоты. В ряде работ немецких исследователей описано получение рекомбинантных штаммов дрожжей *Y. lipolytica* с делецией или суперэкспрессией генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в метаболизм цитрата. Полученные трансформанты отличались от природных штаммов преимущественным синтезом лимонной кислоты. Было бы целесообразно сравнить кислотообразующую способность полученных диссертантом продуцентов с рекомбинантными штаммами.

2. В главе 2 описание методов культивирования дрожжей приводится в пункте 2.2.1. (Состав и подготовка основной среды) и дублируется в пункте 2.2.3). Нет описания метода определения жирных кислот.

3. В работе имеются некоторые опечатки в нумерации таблицы на с. 108, названии марки прибора на с. 49.

Эти замечания, не снижают научной значимости работы, и их следует рассматривать как пожелание на будущее. В целом, работа написана чётко и логично, хорошо проиллюстрирована таблицами, схемами, цветными фотографиями и рисунками и оставляет самое приятное впечатление. Выводы сформулированы правильно и соответствуют представленным результатам.

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 3 статьи в международных журналах (Journal of the American Oil Chemists Society, Applied Microbiology and Biotechnology, Bioresource Technology), индексируемых в системах Web of Science и PubMed, 2 статьи в российских научных журналах “Микробиология”, “Прикладная биохимия и микробиология”, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, определенных ВАК РФ для публикации результатов научных

исследований. Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены в 11-ти различных Международных научных конференциях и научных школах.

Автореферат четко структурирован и позволяет оценить все полученные результаты диссертационного исследования, а также описывает достаточно подробно новизну и практическую значимость результатов.

**Заключение.** По совокупности проведенных теоретических изысканий и экспериментальных работ, с учетом новизны, научной ценности и практической значимости полученных результатов и сформулированных выводов диссертация Луниной Юлии Николаевны “Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого растительного сырья”, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук является законченным научным исследованием, соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842 и является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для развития фундаментальных представлений о закономерностях биосинтеза лимонной кислоты и создания научных основ технологии получения лимонной кислоты с помощью мутантных штаммов дрожжей *Y. lipolytica* из возобновляемого растительного сырья.

Автор диссертации - Лунина Юлия Николаевна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв обсужден на семинаре БРЦ ВКПМ Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов 2 февраля 2016 г., протокол № 2.

Исп. Директор Национального биоресурсного центра-  
Всероссийская коллекция  
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ),  
ГНЦ ГосНИИгенетика  
докт. биол. наук, проф.

Сергей Павлович Синеокий

117545, Российская Федерация, г. Москва,  
1-й Дорожный проезд, д. 1., тел/факс  
e-mail: lab19@genetika.ru



подпись  
заверяет печать

указан в протоколе  
Лунинский  
С.В.