

На правах рукописи

ЛУНИНА ЮЛИЯ НИКОЛАЕВНА

**БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ МУТАНТНЫМИ ШТАММАМИ
ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* ИЗ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Специальность: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской
академии наук (ИБФМ РАН)

Научный руководитель: **Моргунов Игорь Григорьевич,**
доктор биологических наук, заведующий
лабораторией аэробного метаболизма
микроорганизмов ИБФМ РАН

Официальные оппоненты: **Рукавцова Елена Борисовна,**
доктор биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории биотехнологии растений
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Филиала Института
биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской
академии наук

Любимов Валерий Юрьевич,
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник группы экологии и физиологии
фототрофных организмов Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное
предприятие Государственный научно-
исследовательский Институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов

Защита состоится «25» февраля 2016 г. в 11 часов 00 минут на заседании
Диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу:
142290, г. Пущино Московской области, проспект Науки, д.5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН.
Автореферат размещен на сайтах <http://vak.ed.gov.ru> и <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Кулаковская

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Растительные ресурсы (древесина хвойных и лиственных пород, ряд крахмалсодержащих культур, злаки) являются одним из самых ценных богатств на земле. Около 1/20 общей продуктивности биосферы составляют продукты сельскохозяйственного производства, которые ежегодно дают 8,7 млрд. тонн органического вещества. Дешевое, а главное возобновляемое растительное сырье становится важным объектом исследований и разработок, комплексных и экологически чистых технологий его переработки в различные продукты, например, белки и липиды, аминокислоты и органические кислоты, которые могут быть использованы в различных производствах (Stephanopoulos, 2007).

Среди продуктов, полученных микробиологическим способом, большой интерес представляет лимонная кислота (ЛК). В мире ежегодное производство ЛК составляет 1 млн. 600 тыс. тонн, а годовой прирост – 3-5% от существующего уровня (Soccol et al., 2006). ЛК обычно используется в пищевой, химической и фармацевтической промышленности, однако в настоящее время направления ее применения расширяются. Например, замена опасных для экологии полифосфатов, входящих в состав СМС, на цитрат натрия.

В патентной и научной литературе имеется мало сведений о биосинтезе ЛК из растительного сырья. В Польше предпринимаются попытки разработать процесс получения ЛК из глюкозо-содержащих гидролизатов древесных отходов с помощью мутантных штаммов *Yarrowia lipolytica* (Woitatowicz et al., 1991). Эти работы не привели к положительным результатам в связи с тем, что мутанты со временем теряли свою кислотообразующую активность, и биохимический механизм синтеза кислоты до конца не изучен. Имеются единичные сведения о биосинтезе ЛК у *Y. lipolytica* из растительных масел (Kamzolova et al., 2005). Однако природные штаммы на маслах продуцируют две кислоты: ЛК и изолимонную (ИЛК), которые являются стереоизомерами. Это снижает выход целевого продукта и осложняет процесс выделения продукта из ферментируемого раствора. Также в литературе имеются данные, что мутант *Candida lipolytica* при росте на глюкозе или глицерине синтезирует ЛК и ИЛК в соотношении 92:8 (Карклиньш, 1993). Вот почему задача получения мутантных штаммов - продуцентов только одной ЛК является весьма актуальной. Ее решение позволит провести разработку микробиологического способа получения этого продукта из возобновляемого сырья.

Цель и задачи исследования

В связи с этим цель настоящей работы заключалась в разработке процессов получения лимонной кислоты из возобновляемых источников углерода с помощью мутантных штаммов дрожжей *Y. lipolytica*.

В число основных задач входило:

1. Получение мутантных штаммов *Y. lipolytica* - продуцентов ЛК с применением УФ-облучения, *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидина и их комбинированного воздействия;
2. Разработка рациональной схемы отбора мутантов и экспресс-методов выявления активных продуцентов ЛК;
3. Исследование физиолого-биохимических особенностей мутантов-продуцентов ЛК при различных режимах культивирования в среде с глюкозой (периодический с подпиткой, отъемно-доливной, с применением мембранного модуля);

4. Изучение способности мутанта *Y. lipolytica* №15 синтезировать ЛК при росте в среде с глюкозо-содержащими ферментолизатами древесных отходов. Определение условий культивирования, обеспечивающих направленное образование ЛК;

5. Изучение закономерностей биосинтеза ЛК из растительных масел у мутанта *Y. lipolytica* №15 и разработка на этой основе эффективного способа получения ЛК.

Научная новизна работы

В результате обработки природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 ультрафиолетовым облучением и *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидином, а также их комбинированным воздействием селекционированы мутанты, характеризующиеся направленным биосинтезом ЛК в среде с различными возобновляемыми источниками углерода (глюкоза, рапсовое масло и другие).

Разработан эффективный метод отбора мутантов – продуцентов ЛК. Для быстрого отбора мутантов предложены селективные среды 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, повышающей частоту выявления мутантов на порядки, на втором этапе отбора. Предположено, что селекция на средах с ацетатом/цитратом дает возможность направленно выявлять мутанты с блокировкой ЦТК и/или глиоксилатного цикла на уровне одного или нескольких ферментов, у которых соотношение цитрата к изоцитрату сдвинуто в сторону преимущественного синтеза ЛК. С помощью мутагенеза удалось селекционировать мутанты, у которых преимущественный биосинтез ЛК происходит вследствие высокой активности цитратсинтазы и резко сниженной активности аконитат-гидратазы и НАД-изоцитрат-дегидрогеназы.

Практическая значимость работы

С применением мутанта *Y. lipolytica* №15 в условиях периодического культивирования достигнута концентрация ЛК в среде с глюкозой, равная 100 г/л и в среде с рапсовым маслом - 175 г/л ЛК, что достаточно для реализации в промышленном масштабе. 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 25-40 г/л.

Впервые была показана возможность получения ЛК и биомассы, обогащенной протеином и незаменимыми аминокислотами, из глюкозо-содержащих отходов лесопромышленного комплекса (ЛПК).

Апробация работы

Основные результаты работы были доложены, обсуждены и опубликованы в материалах следующих симпозиумов и конференций: на 2-ом Конгрессе Федерации европейских микробиологических обществ (Мадрид, Испания, 2006), на международных конференциях «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск-Раков, Беларусь, 2006, 2008, 2010), на Международных Пущинских школах-конференциях для молодых учёных (2006, 2007, 2010), на Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2011» (Тула, 2011), на конференции по биоорганической химии и биотехнологии, посвященной памяти академика Ю.А. Овчинникова (Москва-Пушино, 2011), а также ежегодных стендовых сессиях ИБФМ РАН (2010-2011, 2014).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 16 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследований, изложение полученных результатов и их обсуждение, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 127 страницах, содержит 26 таблиц и 21 рисунок. Список литературы включает 203 наименования, из них 129 – публикации в иностранных изданиях.

Место проведения работы

Работа выполнялась в лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) и в Университете естественных наук (г. Вроцлав, Польша).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы. Объектом исследования являлся природный штамм дрожжей *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 (704) из коллекции культур ИБФМ РАН, способный синтезировать ЛК и ИЛК в среде, содержащей *n*-алканы, этанол, глицерин и другие субстраты. Штамм поддерживался на агаризованной среде Ридер с глюкозой при 4⁰ С.

Методика получения мутантов – активных продуцентов лимонной кислоты. В качестве мутагенных агентов использовали УФ-лучи (длина волны 200-400 нм), источником которых служила бактерицидная лампа (ВИО-2, Россия, «Фимет») с расстояния 10 см; и *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидин (НГ) в диапазоне концентраций от 0 до 100 мкг/мл.

Для получения мутантов культуру *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 выращивали на питательной среде Ридер следующего состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 3,0; MgSO₄·7H₂O – 0,7; Ca(NO₃)₂ – 0,4; NaCl – 0,5; KH₂PO₄ – 0,1; K₂HPO₄ – 1,0, смесь микроэлементов по Буркгольдеру (Burkholder, 1944), дрожжевой экстракт «Difco» – 0,5. Суспензию клеток обрабатывали УФ и НГ. В качестве контроля использовали необработанную суспензию.

Для повторной обработки УФ-штаммов использовали дозу индукции НГ – 50 мкг/мл, а для повторной обработки НГ-вариантов использовали диапазон облучения 3-6 минут.

Методы культивирования. Дрожжи культивировали в колбах на качалке или в ферментере АНКУМ-2М (Россия), объемом 3 л (исходный объем среды 1,5 л) и объемом 10 л (исходный объем среды 5,0 л) общепринятыми методами в минерально-солевой среде Ридер. Источником углерода и энергии служила глюкоза, глюкозосодержащее сырье, рапсовое масло и глицерин. Условием сверхсинтеза ЛК являлось лимитирование роста клеток азотом.

Культивирование в режиме отъемов-доливов проводилось в ферментере Biostat В Plus («Sartorius», Germany) объемом 5 л (исходный объем среды 2,0 л) на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 50,0; NH₄Cl – 4,0; MgSO₄·7H₂O – 1,0; K₂HPO₄ –

0,2; дрожжевой экстракт «Difco» – 1,0. В первые 192 ч процесс осуществляли в периодическом режиме, затем часть культуральной жидкости (40%, 30%) сливалась, и в ферментер добавлялась свежая питательная среда. Процесс повторяли 4 раза для каждого варианта.

Непрерывное культивирование селектанта *Y. lipolytica* № 15 осуществляли в ферментере Biostat В Braun (Германия) объемом 3 литра (с исходным объемом 1,2 л) на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; бакто-пептон - 5,0; дрожжевой экстракт «Difco» – 3,0, мальтозный экстракт - 3,0. Среда для непрерывного культивирования содержала (г/л): глюкоза - 50, бакто-пептон – 0,75. Ферментер оснащен выносным спиральным мембранным модулем (Bioengineering AG) и перистальтическим насосом (Ismatec).

Аналитические методы. Биомассу определяли весовым методом с использованием мембранных фильтров "Synpor" № 4 ("Хемапол", Чехословакия).

Содержание ионов аммония определяли потенциометрическим методом с помощью ионоселективного электрода «Эком-NH₄» (Экотест-120, ИЭЛРАН НПП ЭКОНИКС).

Содержание глюкозы определяли фотометрическим методом с использованием глюкозооксидазы с использованием набора реактивов фирмы «Диакон» (Россия).

Концентрацию ЛК и ИЛК определяли с помощью ВЭЖХ на колонке Inertsil ODS-3 (250x4мм) (Элсико, Россия) с обращенной фазой. В качестве подвижной фазы использовали 20 мМ Н₃РO₄. Скорость элюции составляла 1 мл/мин, температура 35°, детекция – при 210 нм. Для построения калибровочной кривой использовали стандарты ЛК и ИЛК фирмы Voehringer Mannheim (Германия). Дополнительно ЛК определяли химическим методом, а ИЛК - энзиматическим методом с НАДФ-изоцитратдегидрогеназой.

Активность ферментов определяли на спектрофотометре UV-160 «Shimadzu» (Япония) в бесклеточных гомогенатах клеток, отобранных в разные фазы роста. Дезинтеграцию дрожжей проводили на планетарной мельнице с помощью стеклянных бус «баллотини» или на прессе Френча. Методы измерения активности ферментов подробно изложены в диссертации. Единицу активности определяли как количество фермента, катализирующего превращение одного мкмоль субстрата или образование одного мкмоль продукта в минуту (Ед.).

Стандартная ошибка в экспериментах не превышала 10 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Отбор продуцента и условий культивирования, оптимальных для получения ЛК из глюкозы

На первом этапе работы была изучена 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 (Таблица 1).

Ранее, в работах А.Б. Лозинова с соавторами (1974) показано, что при культивировании дрожжей на полноценных питательных средах образования ЛК не происходит. Условием сверхсинтеза ЛК является лимитирование роста дрожжей минеральными компонентами среды – азотом, фосфором или серой при одновременном избыточном содержании в среде источника углерода. Поэтому

исследуемые дрожжи культивировали в аэрируемых на качалке колбах в условиях лимитирования роста азотом. Концентрацию азота подбирали с таким расчетом, чтобы биомасса не превышала 3,5 г/л сухих клеток во избежание лимитирования роста кислородом; содержание глюкозы в среде – 20 г/л; в качестве источника витаминов использовали тиамин (100 мкг/л); объем питательной среды в колбах – 50 мл. Определение биомассы, содержания ЛК и ИЛК в культуральной жидкости проводили на 6 сутки культивирования. Как видно из таблицы 1, все исследуемые штаммы росли на среде с глюкозой, и лимитирование роста клеток азотом приводило к экскреции кислот у большинства исследуемых штаммов (29 из 34). Однако количество ЛК было различно: 19 штаммов экскретировали ЛК в количестве менее 1 г/л, 9 штаммов – от 1 до 7 г/л ЛК и один штамм – *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 обладал наибольшей продукцией ЛК (17,6 г/л ЛК). Одновременно с ЛК большинство штаммов накапливали ИЛК, лучшее соотношение ЛК к ИЛК (6,82:1) отмечалось у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373. Штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 был отобран для дальнейшей работы в качестве продуцента.

Подбор условий, оптимальных для получения ЛК из глюкозы у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 проводили по следующей схеме: клетки, находящиеся в фазе активного кислотообразования (60 ч), отбирали из ферментера, отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, дважды промывали 0,9% NaCl и суспензировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН=7,0). Клеточную суспензию вносили в колбы объемом 50 мл среды Ридер без витаминов и азота и инкубировали на качалке при 29 °С в течении 24 ч при дробном внесении глюкозы. Концентрация клеток во всех вариантах опыта по кислотообразованию поддерживалась на уровне не выше 3,5 г/л. В ходе экспериментов оценивали жизнеспособность клеток. Микроскопирование и анализ внеклеточного белка показали незначительное разрушение клеток в некоторых вариантах опыта.

На рисунке 1 представлены данные о влиянии рН среды, концентрации глюкозы и интенсивности аэрации на биосинтез *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373. При всех исследованных значения рН среды (в диапазоне от 3,0 до 8,0) клетки синтезировали ЛК, интенсивное кислотообразование наблюдалось в интервале рН=4,0–6,0, при более низком значении рН (3,0) и более высоких значениях рН (7,0-8,0) накопление ЛК значительно снижалось (Рисунок 1а).

На биосинтез ЛК также существенное влияние оказывала концентрация глюкозы в среде (Рисунок 1б). При всех исследованных концентрациях глюкозы происходило кислотообразование. Максимальное накопление ЛК наблюдалось при содержании глюкозы в среде до 40 г/л, повышение концентрации глюкозы свыше 50 г/л снижало биосинтез ЛК в 1,5 раза.

Биосинтез ЛК в значительной степени зависит от уровня насыщения среды кислородом (Рисунок 1в). Различные уровни интенсивности аэрации создавали изменением объема среды в колбах - 50 мл (соответствует 0,56 ммоль O₂/л•мин), 100 мл (0,3 ммоль O₂/л•мин), 150 (0,26 ммоль O₂/л•мин) и 200 мл (0,24 ммоль O₂/л•мин) и 250 мл (0,2 ммоль O₂/л•мин). Максимальный синтез ЛК дрожжами *Y. lipolytica* в среде с глюкозой происходил при аэрации 0,24-0,3 ммоль O₂/л•мин, при содержания кислорода, равном 0,56 и 0,2 ммоль O₂/л•мин биосинтез ЛК снижался в 2 раза.

В результате проведенных исследований подобраны условия, обеспечивающие наибольший синтез ЛК дрожжами *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 в среде с глюкозой: рН=4,0-6,0, концентрация глюкозы в среде не выше 40 г/л и интенсивная аэрация не требуется. Оптимизация условий культивирования привела к увеличению биосинтеза ЛК в 2 раза у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373.

Таблица 1. Биосинтез ЛК дрожжами из глюкозы

Организм	Биомасса (г/л)	ЛК (г/л)	ИЛК (г/л)	ЛК:ИЛК
<i>Candida catenulata</i> ВКМ Y-5	2,5	0,2	0,3	1:1,5
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-6	2,0	0	0,1	-
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-2324	1,9	0	0,1	-
<i>Debaryomyces</i> sp.	1,9	0	0	-
<i>Pichia besseyi</i> ВКМ Y-2084	1,65	0,4	0,2	2:1
<i>P. media</i> ВКМ Y-1381	1,35	0,4	0,1	4:1
<i>P. inositovora</i> ВКМ Y-2494	1,25	0,5	0,1	5:1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ВКМ Y-381	1,45	0,3	0,1	3:1
<i>Torulopsis candida</i> 127	1,65	0,45	0,1	4,5:1
<i>Y. lipolytica</i> 12a (ВКМ Y-2366)	2,9	0,31	0	-
<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-47	2,6	0	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 68	3,0	0	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 69	2,5	1,0	0,3	3,3:1
<i>Y. lipolytica</i> 76	2,8	0,3	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 79	2,5	0,4	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 86	2,4	3,8	1,0	3,8:1
<i>Y. lipolytica</i> 212	2,9	6,3	0,86	7,3:1
<i>Y. lipolytica</i> 374/4	2,9	0,86	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 571	3,4	2,74	0,46	6,1:1
<i>Y. lipolytica</i> 582	3,0	0,92	0,3	3:1
<i>Y. lipolytica</i> 585	2,9	1,5	0,2	7,5:1
<i>Y. lipolytica</i> 607	2,5	0,6	0,1	6:1
<i>Y. lipolytica</i> 646	2,7	0,18	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 655	2,2	0,8	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 666	3,0	0,54	0,1	5,4:1
<i>Y. lipolytica</i> 668	2,9	1,52	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 672	3,0	3,5	0,6	5,8:1
<i>Y. lipolytica</i> 683	2,8	0,16	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 694	1,0	0,8	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 695	3,0	2,8	0,7	4:1
<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-2373	3,45	17,60	2,58	6,82:1
<i>Y. lipolytica</i> 709	3,0	0,72	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 710	3,0	0,31	0	-
<i>Y. lipolytica</i> 716	2,4	1,20	0,30	4:1

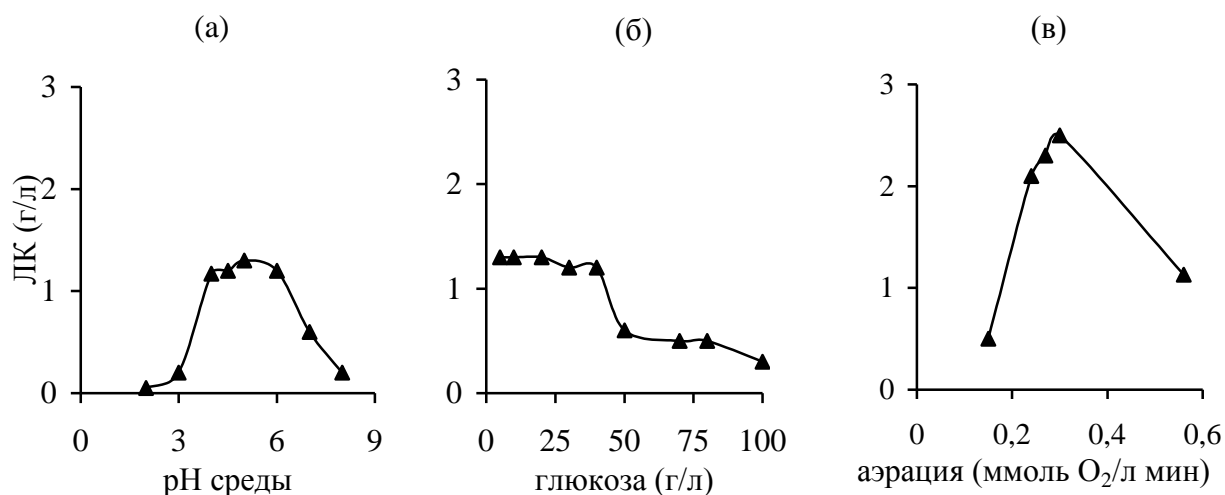


Рисунок 1. Влияние pH среды (а), содержания глюкозы (б) и аэрации (в) и на синтез ЛК у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373

Результаты оптимизации условий кислотообразования дрожжей *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 легли в основу эксперимента в условиях глубинного периодического культивирования в 10-ти л ферментере АНКУМ-2М с контролируемыми значениями температуры, pH и pO_2 .

Культивирование проводили в условиях средней аэрации (pO_2) 30-40% (от насыщения). Поддержание pH среды на уровне 4,5 осуществляли подтитровкой 20% NaOH. Глюкозу вносили дробно порциями по 20 г/л в тот момент, когда концентрация кислорода повышалась на 5-10%, что свидетельствовало о полном потреблении источника углерода.

Данные о динамике роста, потребления азота, накопления ЛК и ИЛК у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 представлены на рисунке 2. Процесс образования ЛК является трехфазным: в первой фазе (до 24 ч) происходит активный рост культуры и потребление азота из среды, в это время ЛК практически не образуется. В фазе экспоненциального роста максимальная удельная скорость роста (μ_{max}) у дрожжей *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 составляла $0,29 \text{ ч}^{-1}$, а выход клеток по массе ($Y_{X/S}$) - 52,1% от потребленной глюкозы. Интенсивный синтез ЛК начинается после снижения содержания азота ниже порогового уровня (60 мг/л) и перехода культуры в фазу замедленного роста и далее – в стационарную фазу роста. Синтез ЛК продолжается до тех пор, пока в среде присутствует глюкоза. На 192 ч роста накопление ЛК составляло 80,0 г/л, и содержание ИЛК было незначительно (8,0 г/л), выход ЛК по массе ($Y_{X/S}$) составил 46% от потребленной глюкозы. Рассмотренные выше данные позволяют сделать заключение, что при длительном культивировании (192 ч) природного штамма-продуцента *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 в среде с глюкозой не удалось достичь высокой концентрации ЛК.

Для промышленной реализации любого биотехнологического процесса желательна концентрация продукта в 100 г/л. В связи с этим задачей следующего этапа работы было получение мутантных штаммов *Y. lipolytica*, обладающих повышенной способностью к синтезу ЛК из глюкозы.

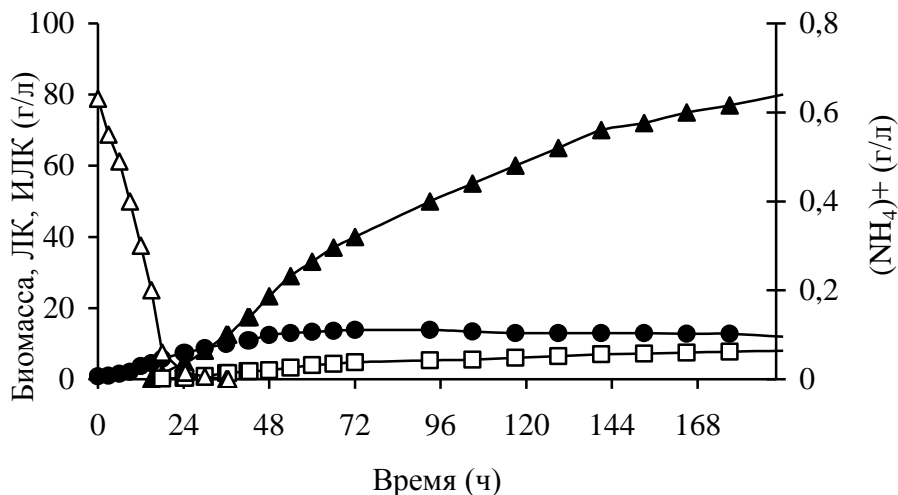


Рисунок 2. Динамика роста (●), потребления азота (Δ) и синтеза ЛК (▲) и ИЛК (□) у природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373

2. Получение мутантных штаммов *Y. lipolytica* с применением УФ-облучения и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина

При получения мутантов в качестве исходного штамма использовали природный штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373, отобранный как наиболее активный продуцент ЛК из глюкозы среди природных штаммов. Мутанты получали при обработке *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 ультрафиолетовым облучением (УФ) и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ), а также их комбинированным воздействием.

Получение мутантов

На рисунке 3 представлены кривые выживаемости дрожжей *Y. lipolytica* в зависимости от дозы облучения УФ и обработки НГ. Следует отметить, что кривые выживаемости клеток дрожжей *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 имели сложный характер: начальный их участок имел прямолинейную зависимость, затем следовало плато, указывающее на то, что облучаемые суспензии содержали клетки, устойчивые к мутагенам. Подобные кривые были получены ранее для этого штамма Н.В. Шишкановой (1973) и указывали на гаплоидность исходного штамма.

Согласно общепринятой методике (Миллер, 1976), анализировали те чашки, где процент выживаемости подвергнутых мутагенному воздействию клеток составлял менее 1% при обработке УФ, т.е. диапазон облучения от 3 до 7 мин и – менее 25% при обработке НГ, т.е. при концентрации 30 - 80 мкг/мл (рисунок 3). Под влиянием УФ-лучей и НГ-обработки из исходного штамма дрожжей *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 были получены самые различные мутанты, со слабым ростом на глюкозе, ауксотрофные, “petit”, разнообразной окраски и другие (Рисунок 4).

Наиболее сложным и ответственным этапом получения мутантов-продуцентов ЛК было создание рациональной схемы тестирования клеток, полученных в результате обработки мутагенами, и быстрый отбор форм, обладающих необходимыми свойствами.

Предполагалось, что клетки дрожжей, утратившие способность к росту на ацетате, как правило, характеризуются нарушениями в ЦТК. Блокировка ЦТК на уровне одного или нескольких ферментов может приводить к повышенному синтезу цитрата клетками (Srege, 1982). Кроме того ранее отмечалось, что мутанты –

продуценты ЛК характеризовались низкой активностью аконитат-гидратазы (АГ), фермента, ответственного за превращение в клетках ЛК в ИЛК (Akiyama et al., 1973; Финогенова, Глазунова, 1982), и при использовании селективной среды с цитратом, удалось селекционировать мутант *Y. lipolytica* 187/1 – продуцент ЛК на н-парафинах (Шишканова, 1973). Отбирались штаммы, которые характеризовались сниженной скоростью роста на средах с ацетатом или цитратом.

Отбор вариантов проводили путем посева отобранных 500 колоний, облученных УФ и 1000 колоний, обработанных НГ на агаризованную среду Ридер с глюкозой и последующей перепечаткой колоний на ту же агаризованную минеральную среду, но с ацетатом (Рисунок 5) или цитратом (для выявления негативного роста).

В результате скрининга на среде с ацетатом было отобрано 10 вариантов, а на среде с цитратом – 6 вариантов; 4-6 минутное УФ воздействие и обработка НГ при концентрации 40–80 мкг/мл дали наибольшее количество измененных форм с положительными свойствами.

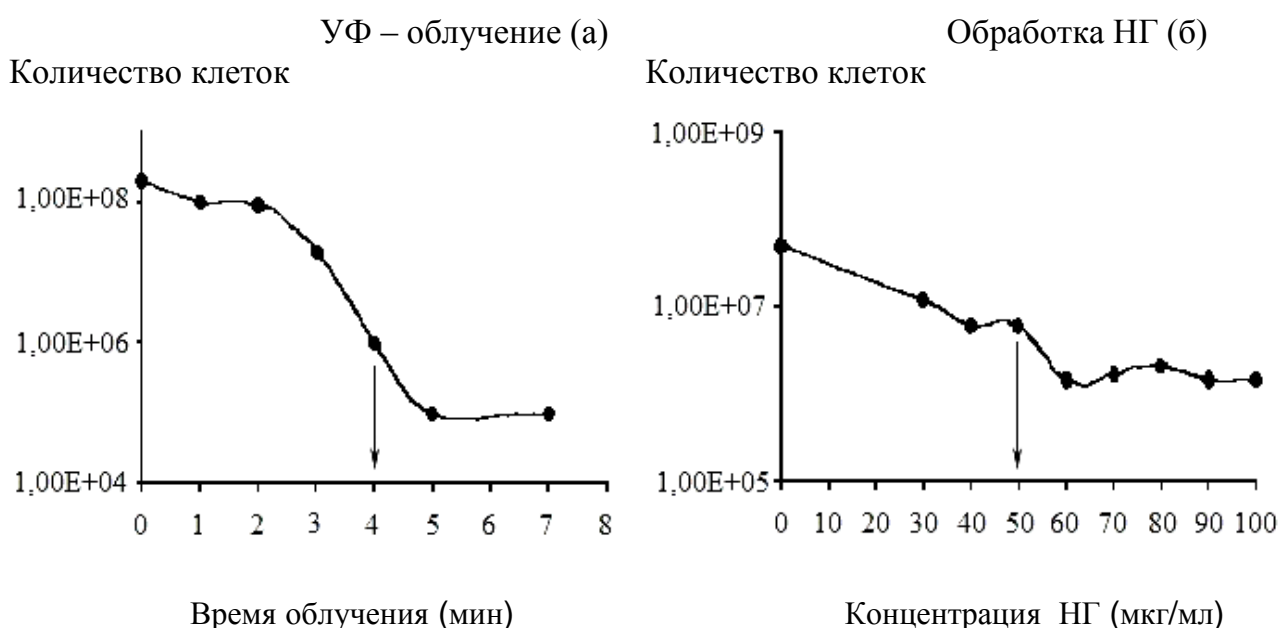


Рисунок 3. Кривые выживаемости штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 при УФ-облучении (а) и после обработки НГ(б). Стрелкой указана доза облучения и концентрация НГ, при которой выживаемость составляет 0,1-1% в случае УФ и 25% в случае НГ.



Рисунок 4. Разнообразие колоний после обработки НГ на глюкозе

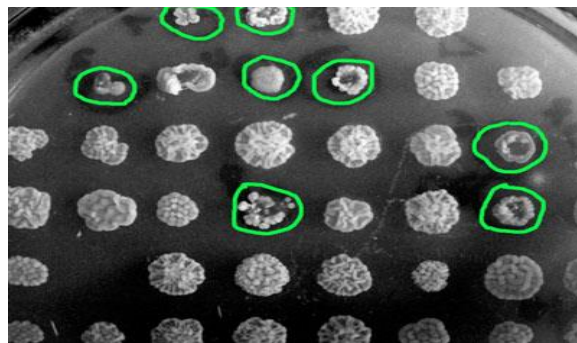


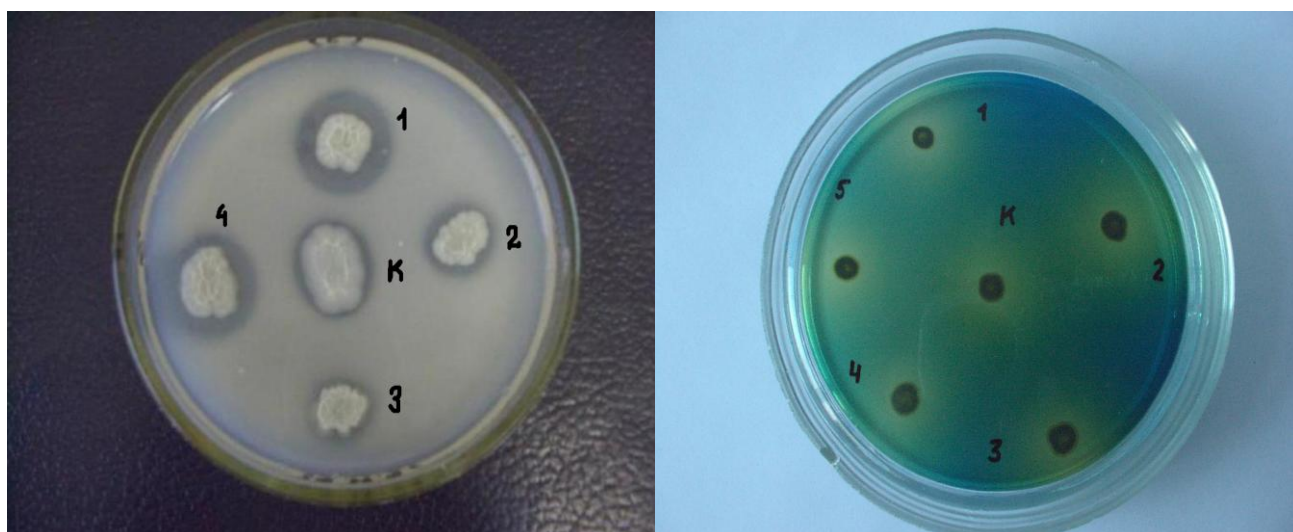
Рисунок 5. Рост колоний на среде с ацетатом

Кислотообразование на твердой среде с мелом или бромкрезолом

16 мутантных штаммов далее подвергались отбору на селективных средах с мелом и индикатором бромкрезоловым зеленым. В основу подготовки среды для экспресс-методов положены три основных принципа: избыток глюкозы, лимитирующая концентрация азота (60 мг/л) и использование только органического источника азота (дрожжевого автолизата) вместо сульфата аммония во избежание влияния физиологической кислотности. В процессе выделения кислот вокруг колоний появлялись различные по величине зоны растворения мела, соответствующие количеству образующихся кислот (Рисунок 6а). Способностью образовывать зоны растворения мела при росте на глюкозе в условиях дефицита азота обладают 12 из 16 отобранных вариантов. Следует отметить, что размеры зоны растворения мела варьируют от 0,1 до 0,8 см. Исходный штамм *Y. lipolytica* ВКМ У-2373 образует зону растворения мела, равную 0,35 см. Варианты, образующие небольшие зоны растворения мела (менее 0,35 см), исключили из дальнейшего обследования как очень слабые кислотообразователи. 4 мутантных штамма, облученные УФ (УФ4-1; УФ5; УФ5-1; УФ5-6) и 4 мутанта, обработанные НГ (НГ40-5; НГ40-6; НГ60-2; НГ80-4) были отобраны для дальнейшей работы.

Также 16 отобранных вариантов оценивали на активность кислотообразования на индикаторных чашках с бромкрезоловым зеленым. По мере роста культуры и накопления ЛК вокруг колоний, окраска среды изменялась с синей на желтую. Зоны желтой окраски соответствовали зонам растворения мела вокруг колоний (Рисунок 6б). Следует отметить, что селекция на средах с мелом по сравнению с бромкрезолом позволяет более четко визуально оценивать диаметр зоны вокруг колонии на 7 сутки выращивания, а на среде с бромкрезолом зоны были четко различимы только в первые 3 суток выращивания.

В результате скрининга на селективных средах с мелом и бромкрезолом зеленым были отобраны 8 мутантных штаммов, из которых 4 варианта, получены УФ-облучением и 4 варианта – обработкой НГ. Следует отметить, что тест на твердой среде на кислотообразование не дает возможности однозначно сказать, какая кислота - ЛК или ИЛК накапливается в среде.



а

б

Рис. 6. Кислотообразование мутантов на агаризованных средах с мелом (а) и бромкрезолом (б): №1 – НГ 60-2; №2 – НГ 40-6; №3 – УФ 5-2; №4 – УФ 4-1; №5 – УФ 5-1; К – *Y. lipolytica* ВКМ У-2373

Кислотообразование в жидкой среде

С целью идентификации кислот, а также для проверки результатов, полученных методами селекции на твердых средах, проводили культивирование отобранных вариантов в жидкой среде Ридер с глюкозой в условиях дефицита азота.

На 144 ч культивирования проводили определение биомассы, содержание ЛК и ИЛК. Все исследуемые мутанты способны синтезировать преимущественно ЛК (соотношение ЛК:ИЛК варьировало от 2,6:1 до 14,8:1) (Таблица 2). Однако накопление биомассы, абсолютное количество ЛК и ИЛК, их соотношение были различными в зависимости от штамма. Наименьшее накопление ЛК отмечено у мутанта УФ5-1, а наибольшее накопление ЛК по сравнению с исходным штаммом было отмечено у мутантов УФ5, НГ40-6 и НГ80-4, которые, кроме того, характеризовались низким содержанием ИЛК (соотношение ЛК:ИЛК составляло 14,8:1, 7,58:1 и 8,17:1, соответственно). Максимальное значение выхода ЛК от потребленной глюкозы $Y_{ЛК}$ (более 40 %) отмечено у мутантов УФ4-1, УФ5, УФ5-6, НГ60-2. Следует отметить, что накопление биомассы у мутантов было в среднем на 10,8% ниже, чем у исходного штамма (Таблица 2). В связи с этим была рассчитана продуктивность биосинтеза ЛК (P) для каждого варианта, выраженная как количество кислоты в граммах, продуцируемое 1 граммом клеток.

У мутантов УФ5, НГ40-6 и НГ80-4 продуктивность биосинтеза была в среднем на 23,0 % выше, чем у исходного штамма *Y. lipolytica* ВКМ У-2373. Все три мутанта были выявлены на среде с ацетатом, они характеризовались ослабленным ростом, а на твердой среде с мелом образовывали большие по диаметру зоны растворения мела вокруг колоний (Таблица 2).

Таблица 2. Биосинтез ЛК у УФ и НГ-мутантов

Штамм	Биомасса (г/л)	ЛК (г/л)	ИЛК (г/л)	ЛК:ИЛК	$Y_{ЛК}$, %	P , г ЛК/г	Д, см
<i>Y. lipolytica</i> ВКМ У-2373	3,45	17,60	2,58	6,82:1	40,83	5,29	0,35
УФ4-1	3,25	16,83	1,92	8,70:1	42,80	5,18	0,45
УФ 5	2,95	19,20	1,29	14,8:1	48,66	6,51	0,65
УФ 5-1	2,31	4,29	1,64	2,6:1	9,74	1,86	0,25
УФ 5-6	3,40	16,24	2,31	7,0:1	41,66	4,78	0,55
НГ 40-5	3,60	15,34	2,54	6,04:1	31,20	4,26	0,60
НГ 40-6	2,76	18,12	2,39	7,58:1	39,65	6,57	0,50
НГ60-2	3,30	17,38	2,0	8,16:1	49,65	5,27	0,50
НГ 80-4	3,05	19,76	2,42	8,17:1	39,50	6,48	0,60

3. Получение мутантов с применением комбинированного мутагенеза и оценка их кислотообразующей активности

Для усиления эффективности мутагенов мы применили комбинированный перекрестный мутагенез. 4 НГ- и 4 УФ- мутантных штамма были подвергнуты перекрестно повторной обработке мутагенами. После применения комбинированного мутагенеза было отобрано 1000 колоний. В популяции отобранных клеток обнаруживались мелкие, точечные колонии, гладкие и шероховатые колонии, колонии с измененной пигментацией, 2 колонии характеризовались наличием коричневого пигмента и имели мягкую маслянистую текстуру.

Из 1000 колоний в результате отбора на селективной среде с ацетатом и далее - на средах с мелом и бромкрезолом получены 14 НГ-мутантов, обработанные вторично УФ (НГ/УФ), и 13 УФ-мутантов, обработанные вторично НГ (УФ/НГ).

Все варианты образовывали зоны растворения мела большего или одинакового размера по сравнению с исходным штаммом (Рисунок 7). 21 вариант, у которых зона растворения мела была больше, чем у исходного штамма (более 0,35 см) были проверены на кислотообразование в жидкой среде.

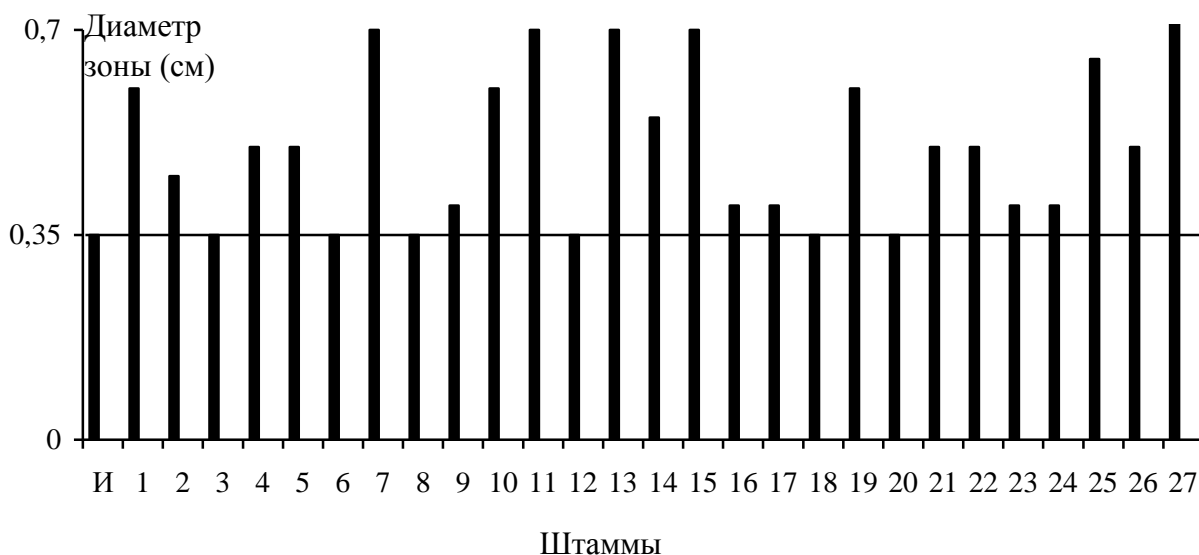


Рисунок 7. Сравнительный анализ кислотообразующей активности на селективной среде с мелом у исходного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 (И) и мутантов (1-27), полученных комбинированным воздействием мутагенов

Штаммы с 1 по 14 получены повторной обработкой НГ-мутантов УФ, и штаммы с 15 по 27 - обработкой УФ-мутантов НГ. У исследуемых штаммов обнаружены различия в накоплении биомассы, интенсивности кислотообразования и соотношении ЛК:ИЛК. Из 27 вариантов только три мутанта (15, 19 и 26) превосходят исходный штамм по накоплению ЛК, накопление ЛК у других мутантов невысокое. У мутантов 7 и 13, продуктивность была на 22,6 и 29,7%, соответственно выше, чем у исходного штамма. У мутантов 15, 19, и 22 продуктивность была выше на 43,9%; выход $Y_{\text{ЛК}}$ от потребленной глюкозы был более 43 % и выше величины исходного штамма (Таблица 3). Таким образом, комбинированный мутагенез на 20 % увеличил продуктивность биосинтеза ЛК из глюкозы.

Последующая работа проводилась с наиболее активным продуцентом - мутантом № 15. Мутант № 15 был получен в результате обработки природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 исходно мутагеном НГ (40 мкг/мл) и последующим УФ-облучением в течение 5 мин.

Ферментация *Y. lipolytica* № 15 осуществлялась методом глубинного периодического культивирования. Процесс проводили при оптимально-подобранных условиях культивирования и сбалансированной питательной среде.

Процесс образования ЛК у мутанта №15 является трехфазным (Рисунок 8): в первой фазе происходит активный рост культуры и потребление азота из среды, в это время кислоты практически не образуются. Интенсивный синтез кислот начинается

после снижения содержания азота ниже порогового уровня (60 мг/л) и перехода культуры в фазу замедленного роста и далее – в стационарную фазу роста. Синтез кислот продолжается до тех пор, пока в среде присутствует глюкоза. На 192 ч мутант №15 накапливает 100 г/л ЛК и 4,3 г/л ИЛК, т.е. соотношение цитрата к изоцитрату - 23:1, $Y_{\text{ЛК}}$ составляет 70% от потребленной глюкозы, в то время как природный штамм синтезирует - 80 г/л ЛК (на 20% меньше) и соотношение цитрата к изоцитрату - 10:1.

Таблица 3. Рост и кислотообразование у дрожжей *Y.lipolytica* ВКМ Y-2373 (И) и мутантных штаммов, полученных в результате комбинированного воздействия УФ и НГ

Штамм	Биомасса, г/л	ЛК, г/л	ИЛК, г/л	ЛК:ИЛК	$Y_{\text{ЛК}}$, %	P, гЛК/г биомассы
И	3,45±0,4	17,60±0,77	2,58±0,34	6,82:1	40,83	5,29
1	3,25±0,3	16,83±0,68	1,92±0,1	8,70:1	42,80	5,18
2	3,00±0,3	15,26±0,98	2,26±0,1	6,75:1	43,01	5,09
4	2,7±0,2	11,62±0,56	2,44±0,1	4,33:1	35,93	4,30
5	2,86±0,3	15,63±0,87	2,31±0,12	6,77:1	45,35	5,47
7	2,51±0,25	15,94±0,89	1,61±0,12	10,0:1	43,90	6,35
9	2,1±0,2	10,86±0,34	1,47±0,12	7,39:1	43,13	5,17
10	2,4 ±0,24	13,96±0,78	2,85±0,43	4,9:1	44,77	5,82
11	2,32±0,23	13,45±0,78	2,36±0,36	5,69:1	36,0	5,79
13	2,39±0,24	16,05±0,98	1,39±0,12	11,5:1	46,58	6,72
14	1,83±0,18	10,37±0,45	2,32±0,32	4,47:1	43,0	5,63
15	2,55±0,26	19,80±1,0	1,70±0,17	11,62:1	44,11	7,61
16	2,9±0,29	14,89±0,67	1,8±0,18	8,27:1	43,0	5,13
17	1,95±0,2	8,7±0,44	1,94±0,19	4,49:1	43,0	4,46
19	2,50±0,25	19,25±0,87	1,70±0,15	11,32:1	42,62	7,70
21	2,78±0,3	14,19±0,78	2,5±0,25	5,68:1	43,0	5,10
22	2,24±0,22	17,64±0,77	1,55±0,15	11,41:1	44,30	7,66
23	3,35±0,3	16,86±0,66	1,89±0,18	9,11:1	40,0	5,03
24	2,85±0,3	12,92±0,44	1,8±0,16	7,18:1	33,32	4,53
25	2,53±0,25	16,39±0,67	1,99±0,19	8,24:1	45,0	6,48
26	3,4±0,3	19,94±0,77	1,87±0,2	10,66:1	42,03	5,86
27	2,61±0,25	15,37±0,57	2,7±0,3	5,69:1	42,11	5,89

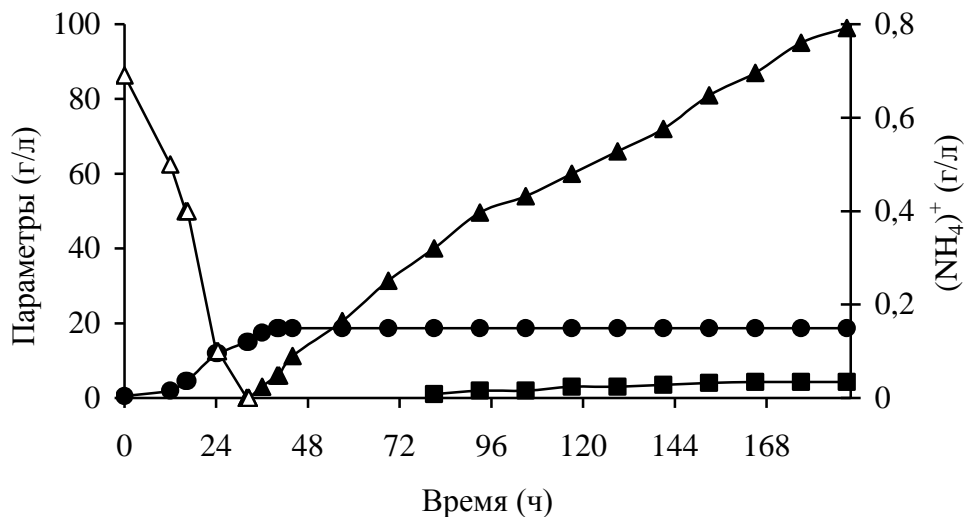


Рисунок 8. Динамика роста (●), потребления сульфата аммония (Δ), синтеза ЛК (▲) и ИЛК (■) у *Y. lipolytica* № 15 в среде с глюкозой.

В научной и доступной патентной литературе синтез ЛК из глюкозы не превышает 100 г/л с выходом не более 50%. Таким образом, мы селекционированы мутант с продуктивностью мирового уровня.

Мутант № 15 был охарактеризован по культурально-морфологическим свойствам.

Культурально-морфологические признаки:

Трёхсуточная культура в жидкой глюкозо-пептонной среде представлена овальными, удлинённо-овальными и округлыми клетками размером 4,0-6,0 x 4,5-13 мкм, также встречаются небольшие округлые клетки 2,0 x 3,0 мкм. Почкование полярное или латеральное. Клетки единичные или в цепочках, включающих 3 - 4 клетки. Штрих на глюкозо-пептонном агаре непрерывный, плоский, блестящий, белого цвета, пастообразный, края ровные. Колонии на сусло-агаре (возраст 4 недели) белого цвета, пастообразные, слегка приподнятые в центре, слегка шероховатые, с фестончатым краем. На 2 сутки роста на жидкой глюкозо-пептонной среде образуются тонкая пленка, кольцо на стенках, тяжёлый осадок на дне пробирки.

Физиологические и биохимические признаки

Строгий аэроб. Сахара не ассимилирует. Ассимилирует: н-алканы, глюкозу, этанол, ацетат, глицерин, глицерин-содержащие отходы производства биодизельного топлива, рапсовое и подсолнечное масло, олеиновую кислоту, янтарную, яблочную, лимонную кислоты. Усваивают азот только в аммонийной форме, способны гидролизовать мочевины. Не растёт в безвитаминовой среде, требует тиамин. Оптимальное рН для роста 5,0. Не растёт при 37°C. Максимальная температура роста при 29°C. Характеризуется высокой активностью экзолипазы. Эти свойства идентичны тем, что описаны в определителе Kreger van Ruy "The Yeast. A taxonomic study" 1984 г., для дрожжей вида *Y. lipolytica*.

Так как в последние годы отмечается, что одним из перспективных направлений является осуществление процесса в непрерывном режиме, а также

использование полупроницаемых мембран с целью удержания биомассы продуцента в ферментере и увеличения эффективности процесса (Anastassiadis et al., 2008, Rimowicz et al., 2010), мы изучали устойчивость положительных свойств мутанта № 15 при продолжительном культивировании. Мы тестировали два режима - рецикл с мембранным модулем и режим отъемом-доливов.

4. Способы культивирования, обеспечивающие продолжительный и стабильный синтез лимонной кислоты

Одним из перспективных способов увеличения продолжительности микробиологических процессов при получении метаболитов, экскретируемых в культуральную жидкость, является культивирование в мембранном биореакторе. Мембранный биореактор дает возможность непрерывно удалять образующийся продукт, что особенно важно при его ингибирующем воздействии на продуцент. Вся биомасса продуцента остается в ферментере и продолжает синтезировать продукт. В ферментер подается среда, содержащая глюкозу и азот (в минимальном количестве, обеспечивающем поддержание клеток в активном состоянии). На рисунке 9 представлены результаты эксперимента с использованием выносного спирального мембранного модуля. Скорость протока и общая продолжительность ферментации 0,014 ч⁻¹ и 480 ч, соответственно. Интенсивное кислотообразование (40-32,1 г/л) наблюдалось до 300 ч. Средняя производительность аппарата и выход ($Y_{ЛК}$) в данный промежуток времени поддерживались и составляли 0,47 г/л·ч и 77% соответственно. После 300 ч наблюдалось снижение синтеза ЛК. Снижение образования ЛК связано не с повышением ее концентрации в культуральной жидкости, а скорее всего со снижением метаболической активности клеток.

Более продолжительный стабильный процесс биосинтеза ЛК был реализован с применением отъемно-доливного метода, при котором производится отъем культуральной жидкости через определенные промежутки времени, и в ферментер добавляется свежая питательная среда с содержанием всех компонентов, в том числе и азота, достаточном для клеточного роста. При проведении экспериментов варьировали количеством доливаемой среды, каждый из которых осуществляли в периодическом режиме, продолжительность циклов 5 суток. Были исследованы следующие варианты: отъем-долив 40% и 30% культуральной жидкости. На рисунке 10 приведены несколько циклов для этих режимов культивирования. Процесс биосинтеза в режиме отъемов-доливов шел интенсивно в течение 1280 ч (53 суток), концентрация ЛК была высокой и составляла 65-70 г/л. Средняя производительность аппарата и выход ($Y_{ЛК}$) в режиме отъемов-доливов составляли 0,255 г/л·ч и 80%, соответственно. Во всех вариантах культивирования в режиме отъемов-доливов содержание ИЛК не превышало 4% от суммы общих кислот, что упрощает процесс выделения ЛК из культуральной жидкости. Кроме того, отъемно-доливной способ позволяет снизить расходы сырья, тепло- и электроэнергии за счет сокращения количества необходимого посевного материала и увеличения времени между циклами подготовки и стерилизации ферментера, что, в свою очередь, позволит снизить себестоимость продукта при промышленном производстве.

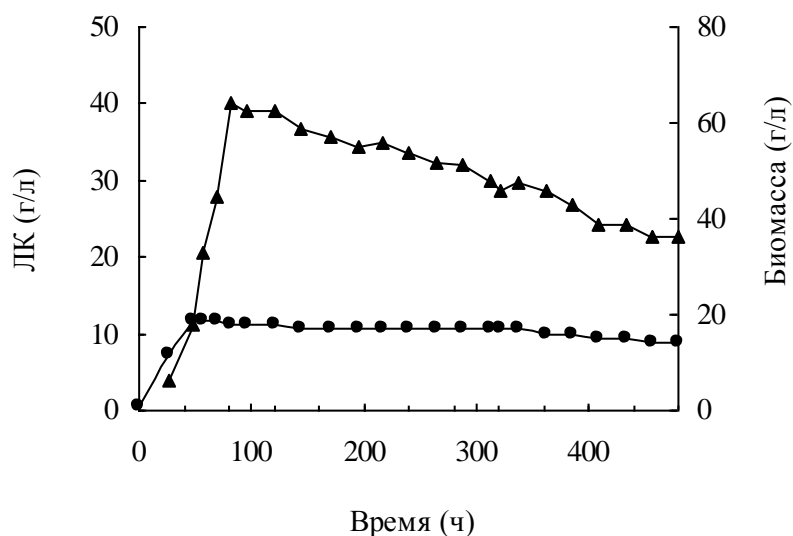


Рисунок 9. Биосинтез ЛК у дрожжей *Y. lipolytica* №15 при использовании мембранного биореактора: ● биомасса, ▲ ЛК.

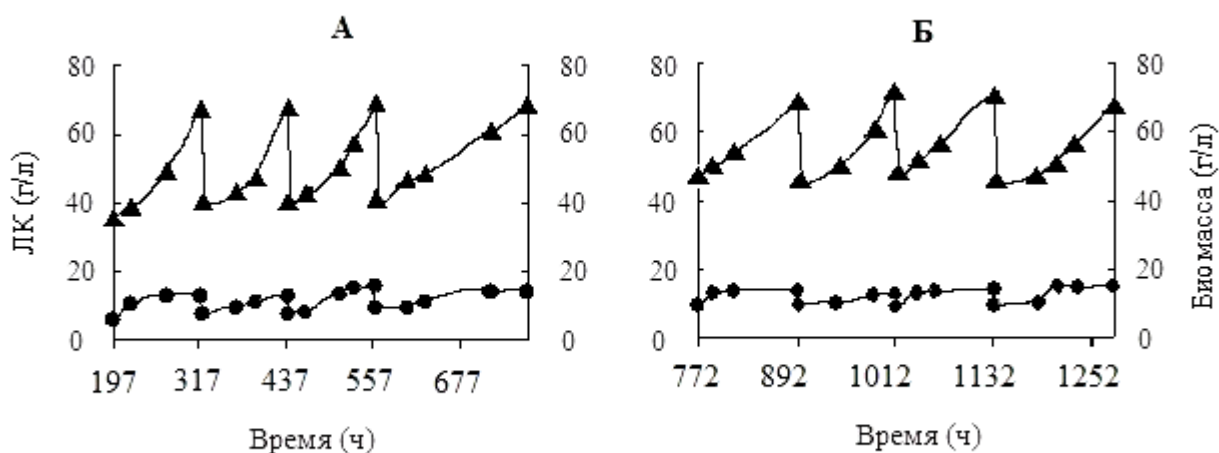


Рисунок 10. Биосинтез ЛК дрожжами *Y. lipolytica* №15 в режиме отъемов–доливов: отъем-долив 40% (А) и 30% (Б): ● биомасса, ▲ ЛК.

5. Биосинтез ЛК в среде с рапсовым маслом

Другой дешевый возобновляемый субстрат – рапсовое масло. Целью данного раздела работы было продолжение исследований, проводимых в лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН, по биосинтезу ЛК из растительных масле у дрожжей *Y. lipolytica*. На рапсовом масле мы изучали способность трех штаммов синтезировать ЛК – природный штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373, мутант № 15, а также мутант *Y. lipolytica* № 1, который был получен Шишкановой Н.В. в 1973 г., обработкой природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 нитрозометилмочевинной и селекционированного как продуцент ЛК из n-алканов (Таблица 4). В разные годы с мутантом № 1 проводилась работа как с продуцентом

Таблица 4. Биосинтез ЛК у *Y. lipolytica* в среде с рапсовым маслом

Параметры	<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-2373	<i>Y. lipolytica</i> № 15	<i>Y. lipolytica</i> № 1
Биомасса (г/л)	21,2	20,0	10,0
Удельная скорость роста (ч ⁻¹)	0,297	0,205	0,200
ЛК (г/л)	87,0	175,0	135,0
ИЛК (г/л)	72,0	5,6	7,8
ЛК:ИЛК	1,21:1	32:1	10,7:1
Объемная продуктивность (г/л·ч)	0,62	1,34	1,25
Выход ЛК (%)	87	150	155

ЛК из этилового спирта, глюкозы и других субстратов.

В среде с рапсовым маслом оба мутанта синтезировали преимущественно ЛК, в отличие от природного штамма, который накапливал примерно равные количества ЛК и ИЛК. Соотношение цитрата к изоцитрату было 32:1 для мутанта № 15 и 11:1 для мутанта № 1. Максимальное накопление ЛК - 175 г/л давал мутант № 15.

Был проведен сравнительный анализ активности ферментов метаболизма рапсового масла и ферментов ЦТК, которые участвуют в синтезе ЛК и ее дальнейшем превращении, у природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 и мутанта *Y. lipolytica* №15.

В таблице 5 представлены данные об активности ферментов начальных этапов метаболизма масла и цикла трикарбоновых кислот. У обоих штаммов при ассимиляции масла с первых часов роста индуцируются глицерол-киназа (ГК), изоцитрат-лиаза (ИЛ) и малат-синтаза (МС). В период кислотообразования глицерол-киназа поддерживалась на высоком уровне, что, по-видимому, связано с активным потреблением глицерина, непрерывно образуемого в ходе всего процесса ассимиляции масла. Также активности изоцитрат-лиазы и малат-синтазы сохранялись на высоком уровне, что, обусловлено активным потреблением образуемых жирных кислот в ходе всего процесса. Для обоих штаммов характерна высокая активность цитрат-синтазы (ЦС), которая повышалась в период синтеза ЛК. Активность этого фермента у мутанта № 15 выше на 34 %, чем у природного штамма. Активность цитрат-синтазы у обоих штаммов значительно превышала активности последующих ферментов цикла: аконитат-гидратазы (АГ) и НАД-зависимой изоцитрат-дегидрогеназы (НАД-ИЦДГ). Соотношение цитрата и изоцитрата определяется соотношением активностей ферментов цитрат-синтазы, аконитазы и НАД-изоцитрат-дегидрогеназы. Высокая активность цитрат-синтазы и резко сниженная активность аконитазы приводит к преимущественному синтезу ЛК у мутанта, в то время как достаточно высокая активность аконитазы при одновременно низкой активности НАД-изоцитрат-дегидрогеназы приводят к экскреции как ЛК, так и ИЛК у природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373. Активность НАД-изоцитрат-дегидрогеназы была низкой, по сравнению с активностями изоцитрат-лиазы и малатсинтазы, что позволяет предположить, что при росте на рапсовом масле у дрожжей наряду с ЦТК активно работает глиоксилатный цикл, который может служить дополнительным источником образования ЛК в дрожжевой клетке.

Таблица 5. Активности ферментов (Ед./мг белка) в среде с рапсовым маслом

Ферменты	<i>Y. lipolytica</i> №15		<i>Y. lipolytica</i> ВКМ У-2373	
	Рост	Синтез	Рост	Синтез
ГК	0,310	0,330	0,250	0,235
ЦС	2,750	3,881	2,440	2,910
АГ	0,200	0,100	1,020	0,805
НАД-ИЦДГ	0,018	0,010	0,060	0,020
ИЛ	0,150	0,180	0,111	0,121
МС	0,070	0,081	0,070	0,102

6. Проверка синтезирующей активности мутанта *Y. lipolytica* №15 на средах с ферментоллизатом осины в колбах

Ферментоллизат получали из измельченных опилок осины - отходов деревоперерабатывающего производства при добавлении Целлюкласта, ферментного препарата целлюлазы гриба *Trichoderma reesei*, который катализирует расщепление плохо сбраживаемой целлюлозы до легко усваиваемых - глюкозы, целлобиозы и высших глюкозосодержащих полимеров. Содержание глюкозы в таком ферментоллизате составляло 15 г/л при общей сумме сахаров 35 г/л.

Процесс образования ЛК у мутанта №15 из глюкозо-содержащих отходов представлен на рисунке 11. При рабочей биомассе 6-7 г/л биосинтез ЛК в условиях периодического культивирования в ферментере был на уровне 22 г/л с выходом 50 %. Низкий выход ЛК обусловлен тем, что в ферментоллизате имеются неусвояемые

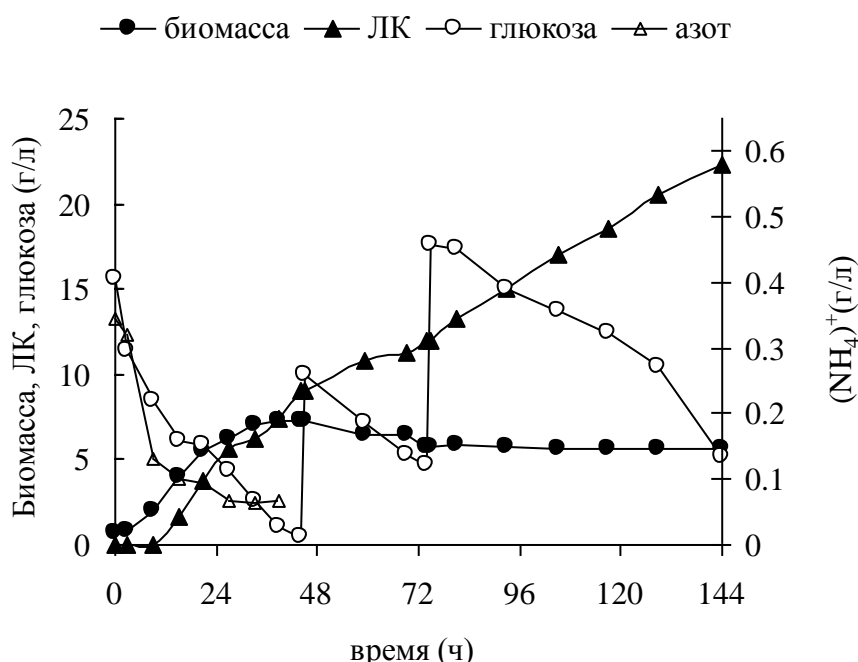


Рисунок 11. Биосинтез ЛК мутантным штаммом *Y. lipolytica* №15 в ферментере (ферментоллизат)

дрожжами *Y. lipolytica* сахара, в том числе, сахароза. Дальнейшая работа может быть направлена на получение рекомбинантных штаммов с встроенным геном инвертазы.

Также изучалась возможность использования биомассы продуцента в сельском хозяйстве в качестве кормовой добавки. Было определено содержания белка в биомассе продуцента – 260 мг/г, а также исследован состав аминокислот, где в наибольшей концентрации присутствовали глутамин, аспарагин, лейцин, валин, лизин. Содержание аланина, треонина, фенилаланина, серина, изолейцина также было высоким от 10 до 16 мг/г клеток.

В таблице 6 приведен сравнительный анализ состава аминокислот в биомассе дрожжей *Y. lipolytica* № 15, выращенных на гидролизате осины, с аминокислотным составом соевого белка. Сравнение дрожжевого белка с соевым показало, что состав аминокислот в обоих белках практически одинаков (<http://fudz.ru/post/244/>). Количество незаменимых аминокислот у дрожжей ниже, чем у сои в 3 раза. Однако, соевые протеины имеют невысокую скорость абсорбции и содержат компоненты, которые препятствуют перевариванию и поглощению множества различных питательных веществ. Перевариваемость биомассы дрожжей составляет 90%, а растительных белков около 80%. Аминокислоты, входящие в состав белка, усваиваются лучше, чем свободные аминокислоты (Промышленная микробиология, 1989).

Таблица 6. Сравнение аминокислотного состава биомассы дрожжей *Y. lipolytica* № 15 с аминокислотным составом сои

АК (заменяемые, незаменимые)	Аминокислотный состав сои (мг/г)	Аминокислотный состав дрожжей на ферментализате (мг/г)
Глутамин	151,2	37,79
Аспарагин	15,9	26,48
Лизин	54,0	19,25
Лейцин	66,0	25,16
Аланин	44,0	15,07
Треонин	40,0	16,01
Фенилаланин	57,0	12,77
Серин	23,7	14,16
Валин	42,0	19,69
Изолейцин	47,0	12,88
Тирозин	-	9,97
Гистидин	23,0	5,96
Метионин	20,0	4,62
Цистеин	4,9	-
ГАМК	18	0,36
Глицин	45,0	16,23

Таким образом, было показано, что ферментализат осины является перспективным источником углерода для роста дрожжей *Y. lipolytica* и синтеза ЛК и биомассы, обогащенной незаменимыми аминокислотами. Разнообразный аминокислотный состав продуцента представляет возможность использования этой биомассы в составе комбикормов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в итоге настоящей работы с помощью УФ-облучения и обработки N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином созданы мутанты *Y. lipolytica*, обладающие повышенной способностью к синтезу ЛК из возобновляемого растительного сырья (глюкозы, рапсового масла, глюкозо-содержащих ферментализатов). Для быстрого отбора мутантов предложены селективные среды 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, повышающей частоту выявления мутантов на порядки, на втором этапе отбора. С помощью мутагенеза удалось селекционировать три мутанта, у которых продуктивность синтеза была выше более, чем на 40 % по сравнению с исходным штаммом. Последующая работа проводилась в ферментере с одним из наиболее активных вариантов - мутантом *Y. lipolytica* № 15.

С применением мутанта *Y. lipolytica* №15 в условиях периодического культивирования достигнута концентрация ЛК в среде с глюкозой, равная 100 г/л и в среде с рапсовым маслом - 175 г/л ЛК, 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 25-40 г/л.

Впервые была показана возможность получения ЛК и биомассы, обогащенной протеином и незаменимыми аминокислотами, из глюкозо-содержащих отходов ЛПК.

ВЫВОДЫ

1. При обработке природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 ультрафиолетом и N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином отобрано 3 мутанта, характеризующихся более высокой (на 23,0%), чем исходный штамм биосинтетической активностью. При дополнительном комбинированном воздействии мутагенов селекционирован высокоактивный мутант *Y. lipolytica* № 15, у которого биосинтетическая активность в среде с глюкозой на 44% выше, чем у исходного штамма.

2. Для быстрого отбора мутантов разработаны селективные среды с цитратом и ацетатом, а также экспресс-методы для выявления активных продуцентов на твердых средах с мелом и бромкрезоловым зеленым, включавшие лимитирующую концентрацию аминного азота и избыток глюкозы.

3. В среде с глюкозой мутант *Y. lipolytica* № 15 в условиях периодического культивирования синтезировал лимонную кислоту с продуктивностью мирового уровня - 100 г/л. Для мутанта показана принципиальная возможность продолжительного активного биосинтеза ЛК с применением мембранного модуля (20 суток) и режима отъемов-доливов (53 суток).

4. Впервые обнаружена способность дрожжей *Y. lipolytica* к сверхсинтезу ЛК из ферментоллизатов древесных отходов. Установлено, что биомасса продуцентов характеризуется высоким содержанием белка и незаменимых аминокислот и может применяться в качестве обогатителя комбикормов.

5. Разработан способ получения ЛК из рапсового масла с помощью мутанта *Y. lipolytica* № 15 с продуктивностью, превосходящей мировой уровень, - 175 г/л ЛК, соотношение цитрат:изоцитрат 32:1, выход 150%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи:

1. Камзолова С.В., Финогенова Т.В., Лунина Ю.Н., Перевозникова О.А., Миначова Л.Н., Моргунов И.Г. Особенности роста на рапсовом масле и синтеза лимонной и изолимонной кислот у дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Микробиология. 2007. Т. 76. № 1. С. 26-32.
2. Финогенова Т.В., Пунтус И.Ф., Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Монастырская С.Е., Моргунов И.Г., Боронин А.М. Получение мутантных штаммов *Yarrowia lipolytica* – продуцентов лимонной кислоты из глюкозы // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 197-202.
3. Kamzolova S.V., Lunina J.N., Morgunov I.G. Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast // Journal of the American Oil Chemists' Society. 2011. V. 88. N 12. P. 1965–1976.
4. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N. The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation // Applied Microbiology and Biotechnology. 2013. V. 97. P. 7387-7397.
5. Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Lunina J.N., Zelenkova N.F., Morgunov I.G. Production of technical-grade sodium citrate from glycerol-containing biodiesel waste by *Yarrowia lipolytica* // Bioresource Technology. 2015. V. 193. P. 250-255.

Тезисы:

6. Пунтус И.Ф., Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Монастырская С.Е., Моргунов И.Г. Получение мутантных штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica* для микробиологического синтеза лимонной кислоты из глюкозы // В сб. Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Материалы международной научной конференции, 2006. ГНУ, Инс-т микробиологии НАН Беларуси. С. 132-134.
7. Лунина Ю.Н., Пунтус И.Ф. Получение мутантных штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica* – продуцентов лимонной и изолимонной кислот. Сб. Тезисов 10-ой Пущинской школы – конференции молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного центра РАН. «Биология – наука XXI века», Пущино, 17-21 апреля 2006. С. 381
8. Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Особенности *Yarrowia lipolytica* № 15 – продуцента лимонной кислоты из глюкозы // Материалы 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пущино, 2007. С. 210.
9. Лунина Ю.Н., Пунтус И.Ф., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Ацетат-негативные мутанты дрожжей *Yarrowia lipolytica* – продуценты лимонной кислоты из глюкозы // В сб. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии”. Материалы VI Международной научной конференции (Минск, 2-6 июня 2008 г.), Т. 1. С. 265-268.
10. Лунина Ю.Н., Руденко А.А., Моргунов И.Г. Определение максимума массового выхода и оптимальной длительности культивирования при синтезе лимонной кислоты суперпродуцентам *Yarrowia lipolytica* из глюкозы. Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии // Материалы VII Международной конференции (Минск, 31 мая - 4 июня 2010г.) С. 124-125.
11. Лунина Ю.Н., Руденко А.А., Моргунов И.Г. Математическое моделирование ингибирующего звена в цикле трикарбоновых кислот при синтезе лимонной кислоты дрожжами *Yarrowia lipolytica* на глюкозе // Материалы 14-ой Международной

Пушинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пушкино, 2010. С. 285-286.

12. Лунина Ю.Н., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты из глюкозы при периодическом и отъемно-доливном способах культивирования // Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2011», Тула, 3-4 октября 2011. С. 31.

13. Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Пунтус И.Ф., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты из глюкозы с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Научная конференция по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», Москва – Пушкино, 14-17 ноября 2011 г., С. 43.

14. Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты из глюкозо-содержащих гидролизатов древесины // Первая Пушинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», – Пушкино: ИБФМ РАН, 2014. С. 134.

15. Kamzolova S.V., Lunina J.N., Finogenova T.V., Morgunov I.G. Biosynthesis of citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* grown on vegetable oils. Abstract Book of 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, July 4 – July 8, 2006, Madrid, Spain. P. 200.

16. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N., Golovchenko N.P. Improvement of citric acid production from rapeseed oil by yeast *Yarrowia lipolytica* through initial steps of triglyceride metabolism and its regulation // Proceedings of 7th International Congress of Food technologists, biotechnologists and nutritionists / Medić, Helga (ur.). - Zaprëšić : BARIS d.o.o. , 2011. (ISBN: 978-953-99725-4-5). P. 34-39.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне признательна сотрудникам, способствовавшим выполнению и написанию данной диссертационной работы: к.б.н. Ермаковой И.Т., д.б.н. Козловскому А.Г., проф. Римовичу В. (Вроцлав, Польша), к.б.н. Пунтус И.Ф., Лысанской В.Я., к.б.н. Дедюхиной Э.Г., к.б.н. Зеленковой Н.Ф., а также всем сотрудникам лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов (ИБФМ РАН, г. Пушкино).

Особую благодарность автор выражает своим наставникам и учителям - д.б.н. Моргунову И.Г. и к.б.н. Камзоловой С.В. за постоянное внимание и поддержку.