

На правах рукописи

ЮСУПОВА АЛСУ ИЛЬДАРОВНА

БИОСИНТЕЗ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ДРОЖЖАМИ ИЗ ЭТАНОЛА

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Пушино – 2011

Работа выполнена в лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов
Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Научный руководитель: доктор биологических наук
Моргунов Игорь Григорьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Миронова Галина Дмитриевна

кандидат биологических наук
Ермакова Инна Тихоновна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится «__» _____ 2011 г. в __ часов __ мин.
на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при Учреждении
Российской академии наук Институте биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина РАН по адресу: 142290, Московская обл., г. Пущино,
проспект Науки, д. 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской
академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.
Скрыбина РАН.

Автореферат размещён на сайте: <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан “__” _____ 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук



В.М. Вагабов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Янтарная кислота (ЯК) широко используется в химической промышленности в качестве исходного сырья для производства различных четырехуглеродных соединений; на её основе получают биodeградируемые полимеры, применяемые при производстве пищевых плёнок и упаковок, средств личной гигиены и одноразовой посуды. В пищевой промышленности ЯК применяется в качестве пищевой добавки, подкислителя и консерванта. В последние годы ЯК стала применяться в здравоохранении. Исследованиями научной школы М.Н. Кондрашовой (ИТЭБ РАН) показано, что ЯК является сигнальным веществом, связывающим энергетическую и гормональную системы организма. На основании этих исследований разработан ряд биологически активных добавок и лекарственных средств на основе ЯК. Производство ЯК ежегодно возрастает не менее, чем на 10% (Sauer et al., 2008).

В настоящее время ЯК получают методом химического синтеза из малеиновой кислоты или ее ангидрида, с использованием дорогостоящего катализатора ванадия. Известно, что малеиновая кислота и соединения ванадия являются клеточными ядами, и даже небольшие их примеси резко снижают качество ЯК. Также для получения ЯК используется процесс термического разложения янтаря и его очистки путем многократной перекристаллизации; однако этот процесс является дорогостоящим.

В последние годы наиболее перспективным рассматривается микробиологический синтез ЯК, при котором произведенный продукт характеризуется высокой чистотой и по своему конформерному составу близок к природной субстанции. По оценке специалистов замена химического метода получения ЯК на микробиологический снизит не только риск загрязнения окружающей среды, но и увеличит производство ЯК с 16 до 270 000 т/год, что, в свою очередь, может существенно расширить сферы применения ЯК и химических соединений, полученных на её основе.

В литературе имеется мало сведений о сверхсинтезе ЯК микроорганизмами. В лабораториях США, Китая и Франции предпринимались попытки разработать промышленный процесс получения ЯК с помощью различных генетически-модифицированных мутантных штаммов анаэробных бактерий *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Escherichia coli* и *Mannheimia succiniciproducens* при их росте на углеводах. Эти работы не привели к положительным результатам в связи с тем, что мутанты со временем теряли свою кислотообразующую активность. Имеются данные о сверхсинтезе ЯК у аэробных организмов - дрожжей и грибов (Sato et al., 1972; Ермакова, Мандева, 1981), но дальнейшего развития эти исследования не получили. Большая потребность в ЯК при всей сложности её химического синтеза, делает проблему разработки микробиологического способа её получения весьма актуальной.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы было изучение закономерностей синтеза ЯК дрожжами из этанола и разработка способа получения и выделения этого продукта.

В число основных задач входило:

1. Изучение способности дрожжей различного таксономического положения синтезировать ЯК;
2. Определение условий культивирования дрожжей, оптимальных для получения ЯК;
3. Исследование физиолого-биохимических особенностей роста дрожжей в среде с этанолом в условиях сверхсинтеза ЯК;
4. Разработка микробиологического способа получения ЯК из α -кетоглутаровой кислоты (КГК) с участием тиамин-ауксотрофных дрожжей *Yarrowia lipolytica*;
5. Разработка метода выделения и очистки препарата ЯК высокой чистоты;
6. Сравнение биологической активности полученного препарата с коммерческими синтетическими препаратами.

Научная новизна работы

Впервые установлена принципиальная возможность направленного синтеза ЯК дрожжами из этанола при лимитировании их роста источником азота; отобраны наиболее активные продуценты *Candida zeylanoides* ВКМ Y-2324 и *S. catenulata* ВКМ Y-5; оптимизированы условия культивирования (рН среды, концентрация растворенного кислорода) и состав питательной среды (концентрации азота, этанола и микроэлементов), обеспечивающие максимальный синтез ЯК.

Показано, что сверхсинтез ЯК у *C. zeylanoides* ВКМ Y-2324 и *S. catenulata* ВКМ Y-5 обусловлен особенностью функционирования глиоксилатного цикла, в частности высокой активностью ферментов цитратсинтазы, аконитат-гидратазы и изоцитрат-лиазы.

Впервые разработан принципиально новый способ получения ЯК, включающий последовательный микробиологический синтез КГК из этанола тиамин-ауксотрофными дрожжами *Y. lipolytica* ВКМ Y-2412 и ее дальнейшее эквимольное окисление до ЯК под воздействием перекиси водорода. Разработана схема выделения ЯК из культуральной жидкости и очистка её до высокой чистоты.

Практическая значимость работы

Предложенный микробиологический способ получения ЯК может заменить дорогостоящий химический синтез. ЯК, полученная данным способом, обеспечивает требуемый уровень чистоты и биологической активности, позволяющий использовать её в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве (протокол о проведении процесса биосинтеза и приготовления опытной партии янтарной кислоты на базе Опытной технологической установки ИБФМ РАН от 20.04.11, протокол о проведении испытаний янтарной кислоты на содержание токсичных элементов ООО «ИЛ Тест-Пушино» № 2695 от 25.04.11, отчёт о проведении доклинических испытаний ГОУ ВПО РГМУ Росздрава № 22/10 от 15.04.10).

Апробация работы

Основные материалы диссертации были представлены на Международных Пущинских школах-конференциях для молодых учёных (2007, 2008, 2010), ежегодных стендовых сессиях ИБФМ РАН (2007-2009), Международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва, 2008), Первом научно-практическом симпозиуме «Научная молодёжь – биотехнологии России», (Пушино, 2008), Российском молодёжном инновационном конвенте (Москва, 2008), Форуме молодых учёных и 35-ом FEBS конгрессе (Гётеборг, Швеция, 2010).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе, 4 статьи 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, приложений. Работа изложена на _____ страницах, содержит _____ таблицы и _____ рисунков. Список литературы включает _____ наименований, из них _____ – публикации в иностранных изданиях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы. Объектами исследования служили 32 штамма дрожжей, относящихся к родам *Candida*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Debaromyces*, *Pichia* и *Torulopsis* (табл. 1). Все штаммы были получены из музея лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН.

Состав среды культивирования. Дрожжи выращивали в минеральной среде Ридер следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,4; NaCl – 0,5; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 0,1; микроэлементы по Буркгольдеру (Burkholder et al., 1944) (мг/мл): J^+ – 0,1, B^+ – 0,01, Mn^{2+} – 0,01, Zn^{2+} – 0,03, Cu^{2+} – 0,01, Mo^{2+} – 0,01, Fe^{2+} – 0,05. В качестве источника витаминов в среду вносили (мг/л): тиамин – 0,5, биотин – 0,001, пантотенат – 0,5, инозит – 10, никотиновую кислоту – 1,0, пиридоксин – 0,5. Источником углерода в экспериментах служил этиловый спирт ректифицированный из пищевого сырья по ГОСТ Р 51652-2000. Этанол во всех опытах давали дробно в количестве, обеспечивающем его постоянное присутствие в среде. Концентрации этанола, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 и тиамина изменялись в зависимости от целей эксперимента и указаны в тексте.

Методы культивирования. Культивирование в зависимости от целей исследования проводили в пробирках и колбах на качалке или в ферментёре АНКУМ-2М. Для отбора продуцентов ЯК культивирование дрожжей проводили при 29 °С в больших пробирках (20 x 2 см) с 5 мл среды Ридер. Периодическое культивирование дрожжей на качалке (180-200 об/мин) проводили при температуре 29 °С в колбах объемом 750 мл с 50 мл среды Ридер. Значение рН

поддерживали на уровне 5,0–6,0 систематическим внесением 5–10% раствора NaOH или KOH. Для выращивания дрожжей в ферментёре в режиме периодического культивирования использовали 10-л аппараты АНКУМ-2М с 5 л среды Ридер в условиях поддержания следующих параметров на постоянном уровне: температура 29 °С для дрожжей *C. catenulata* ВКМ У-5 и *C. zeylanoides* ВКМ У-2324, и 30 °С для дрожжей *Y. lipolytica* ВКМ У-2412, рН среды на уровне значения 5,0 для дрожжей *C. catenulata* и *C. zeylanoides*; рН=3,5 для дрожжей *Y. lipolytica*, концентрация растворенного кислорода рО₂ 55-60% насыщения.

Анализ метаболитов. Рост культур контролировали путем измерения веса сухой биомассы или по величине оптической плотности клеточной суспензии. В культуральной жидкости проводили определение содержания этанола методом газожидкостной хроматографии и азота с использованием ионметра. Содержание органических кислот определяли на HPLC хроматографе (LKB, Швеция) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве стандартов использовали набор органических кислот фирмы Sigma (США) и Реахим (Россия). Содержание отдельных органических кислот дополнительно анализировали энзиматическими методами.

Выделение целевого продукта. ЯК из фильтрата культуральной жидкости дрожжей *Y. lipolytica* экстрагировали этанолом и выделяли в кристаллическом виде. Последовательность операций подробно изложена в диссертации.

Методы определения активностей ферментов подробно изложены в диссертации.

Определение активности дыхания. В работе использовали митохондрии из печени крыс Вистар. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования. Суспензию митохондрий, содержащую 60 мг/мл белка, хранили на льду. Дыхание митохондрий регистрировали на полярографе при 26 °С кислородным электродом типа Кларка. Мембранный потенциал митохондрий измеряли с использованием чувствительного электрода тетрафенилфосфония.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Скрининг дрожжей и отбор продуцентов ЯК из этанола в условиях лимитирования роста азотом

В задачу данного раздела работы входило: в сравнительном аспекте на представителях большого числа разных видов дрожжей выяснить, может ли ЯК экскретироваться из клетки в макроколичествах. Были изучены 32 штамма дрожжей, относящихся к разным видам и родам (*Debaromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Yarrowia* и *Torulopsis*). В качестве основного субстрата был выбран этиловый спирт. Использование этанола в качестве субстрата обеспечивает образование продукта, который может применяться в пищевой и медицинской промышленности.

Ранее И.Т. Ермаковой и Р. Мандевой (1981) было обнаружено, что ЯК образуется только в условиях лимитирования роста дрожжей азотом, поэтому дрожжи культивировали в аэрируемых на качалке пробирках в условиях лимитирования роста азотом. Концентрацию азота подбирали с таким расчетом,

чтобы биомасса не превышала 2 г/л во избежание лимитирования роста кислородом. Этанол вносили дробно (1-2 г/л) по мере потребления.

Анализ метаболитов, накопившихся в культуральной жидкости, проводили через 24 ч после перехода культуры в стационарную фазу. Состав метаболитов, выделяющихся при лимитировании роста азотом у исследованных дрожжей, представлен в табл. 1. Большинство исследуемых штаммов (29 из 32) экскретировали ЯК в среде с этанолом. Однако количество ЯК у исследуемых штаммов было различно: 18 штаммов экскретировали ЯК в количестве менее 0,1 г/г клеток, 9 штаммов – от 0,1 до 0,5 г/г клеток и два штамма – *C. zeylanoides* ВКМ Y-2324 и *C. catenulata* ВКМ Y-5 обладали наибольшей продукцией ЯК (1,2 и 1,5 г/г клеток, соответственно).

Таблица 1. Биосинтез органических кислот дрожжами из этанола

Организм	ЯК (г/г)	УК (г/г)	ЛК (г/г)	ИЛК (г/г)	КГК (г/г)	ЯБК (г/г)	ФК (г/г)
<i>Candida catenulata</i> ВКМ Y-5	1,50	0,1	0,2	0,3	0,3	0,6	0,08
<i>C. mycoderma</i> ВКМ Y-240	0,10	0,1	0	0	0,3	0,1	0,08
<i>C. rugosa</i> ВКМ Y-67	0	0,1	0,1	0,01	4,2	0	0,07
<i>C. paludigena</i> ВКМ Y-2443	0,40	0,5	0	0	0,5	0,3	0,07
<i>C. utilis</i> ВКМ Y-74	0,42	0,1	1,0	0,1	0,3	0,45	0,10
<i>C. utilis</i> 766	0,10	0,1	0	0,1	0,5	0,1	0,12
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-6	0,50	0,45	0	0,1	0,5	0,5	0,13
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-14	0,10	0,1	0	0,1	0,4	0,1	0,10
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-2324	1,20	0,1	0	0,1	0,3	0,8	0,08
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-1543	0,10	0,1	0	0,1	0,3	0,4	0,07
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-2595	0,43	0,1	0	0,1	0,5	0,3	0,06
<i>C. valida</i> ВКМ Y-934	0	0,1	0	0,1	0,5	0,1	0,01
<i>Debaromyces</i> sp.	0,10	0,1	0	0	0,1	0,1	0,10
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> ВКМ Y-589	0,08	0,6	0,1	0	0,2	0,1	0,05
<i>Pichia anomala</i> ВКМ Y-118	0,10	0,1	0	0	0,4	0,1	0,07
<i>P. besseyi</i> ВКМ Y-2084	0,45	0,1	0,4	0,2	0,4	0,3	0,03
<i>P. media</i> ВКМ Y-1381	0,10	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,04
<i>P. guilliermondii</i> H-P-4	0,45	0,1	0,08	1,0	0,1	0,4	0,07
<i>P. guilliermondii</i> 916	0,09	0,5	0,34	1,1	0,15	0,1	0,05
<i>P. inositovora</i> ВКМ Y-2494	0,38	0,09	0,5	0,1	1,3	0,4	0,05
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ВКМ Y-381	0,08	0,5	0,3	0,1	0,3	0,1	0,06
<i>Torulopsis candida</i> 127	0,07	0	0,45	0,1	0	0,1	0,07
<i>T. candida</i> 420	0,10	0,4	0,3	0,1	0	0,1	0,08
<i>Yarrowia lipolytica</i> 12a (ВКМ Y-2366)	0,09	0,1	0	0	0,5	0,1	0,06
<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-47	0,45	0,1	0,5	0,3	0,4	0,3	0,10
<i>Y. lipolytica</i> 69	0,50	0,1	1,2	0,4	0,3	0,4	0,12
<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-57	0,07	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,06
<i>Y. lipolytica</i> 212 (ВКМ Y-2412)	0,09	0,1	0,3	0,4	0,4	0,1	0,20
<i>Y. lipolytica</i> 374/4	0,08	0,1	0,1	0,01	0,4	0,1	0,02
<i>Y. lipolytica</i> 585	0	0,08	0,1	0,3	0,3	0,1	0,08
<i>Y. lipolytica</i> 695	0,10	0,1	0,5	0,1	0,4	0,1	0,10
<i>Y. lipolytica</i> 704 (ВКМ Y-2373)	0,10	0	1,5	2,0	0,3	0,4	0,08

Кислоты: ЯК – янтарная, УК - уксусная, ЛК - лимонная, ИЛК - изолимонная, КГК- α-кетоглутаровая, ЯБК – яблочная, ФК – фумаровая.

Наряду с ЯК накапливались и другие органические кислоты, все они относятся к интермедиатам основных метаболических путей окислительного обмена этанола (уксусная кислота, кислоты ЦТК – лимонная, изолимонная, α -кетоглутаровая, яблочная и фумаровая).

Два штамма *C. zeylanoides* ВКМ У-2324 и *C. catenulata* ВКМ У-5 обладали наибольшей продукцией ЯК и были отобраны для дальнейшей работы в качестве продуцентов. О способности дрожжей *C. zeylanoides* продуцировать ЯК из этанола сообщалось ранее И.Т. Ермаковой и Р. Мандевой (1981), однако не было сведений о кислотообразующей способности других родов и видов.

2. Условия и динамика синтеза ЯК у *C. zeylanoides* и *C. catenulata*

Известно, что при культивировании микроорганизмов в условиях лимитирования роста клеток азотом существует прямая зависимость между концентрацией лимитирующего компонента в среде и плотностью биомассы (Pirt, 1975). При исследовании потребности дрожжей *C. catenulata* в азоте показано, что при лимитировании роста азотом линейная зависимость плотности биомассы от концентрации сульфата аммония в среде имела следующий вид: $Y = 4,35x + 0,673$, где Y – биомасса, г/л; x – концентрация сульфата аммония, г/л.

Использование этанола в качестве субстрата роста создаёт определённые трудности из-за токсичности этого соединения для клеток дрожжей. Высокие концентрации этанола влияют на функционирование ферментных систем клетки, тормозят рост и, в некоторых случаях, вызывают гибель микробной клетки. Особенностью роста дрожжей в среде с этанолом является экскреция ацетата, возможной причиной которой является дисбаланс между активностями алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и алкогольоксидазы, что установлено для продуцентов лимонной кислоты. Указывается на важное влияние цинка, интегрального компонента алкогольдегидрогеназы, на метаболизм этанола (Ильченко с соавт., 1994; Камзолова, 1995). В связи с вышеизложенным представлялось важным подобрать оптимальную концентрацию этанола и цинка, при которой углеродный поток будет направлен не на экскрецию ацетата, а в ЦТК.

Влияние этанола на рост дрожжей *C. catenulata* и *C. zeylanoides* исследовали в диапазоне концентраций этанола от 0,2 до 24,0 г/л на полноценной питательной среде.

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что у *C. catenulata* максимальная удельная скорость роста (μ_{\max}) наблюдалась при концентрации этанола, равной 0,2–0,8 г/л. Для *C. zeylanoides* максимальные значения μ_{\max} обнаружены в более широком диапазоне концентраций этанола (0,2 – 2,4 г/л). При повышении концентрации этанола выше 4 г/л у обоих штаммов было отмечено значительное снижение удельной скорости роста. Для последующей работы было рекомендовано дробное внесение этанола в среду культивирования не выше 1,0 г/л для *C. catenulata* и 3,0 г/л для *C. zeylanoides*.

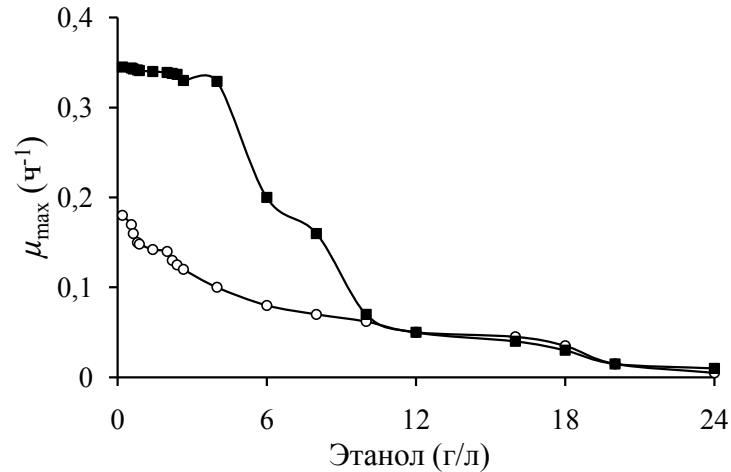


Рис. 1. Зависимость максимальной удельной скорости роста *C. catenulata* (○) и *C. zeylanoides* (■) от содержания этанола в среде.

При исследовании влияния цинка на рост дрожжей и синтез ЯК было показано, что концентрация ионов цинка является эффективным фактором, регулирующим рост клеток и синтез ЯК (табл. 2). У *C. zeylanoides* концентрация ионов Zn^{2+} ниже 0,2 мг/л лимитировала рост культуры, накопление биомассы составляло менее 1,0 г/л, и синтез ЯК отсутствовал. Повышение концентрации ионов Zn^{2+} в среде с 0,2 мг/л до 1,0 мг/л приводило к увеличению биомассы и синтезу ЯК. Дальнейшее повышение концентрации ионов Zn^{2+} до 20,0 мг/л вызывало снижение синтеза ЯК. При концентрации ионов Zn^{2+} , равной 26 мг/л, синтез ЯК был ингибирован. Концентрация ионов Zn^{2+} , равная 0,4 мг/л, была оптимальной для роста *C. zeylanoides* и продукции ЯК. Для *C. catenulata* обнаружен более широкий диапазон концентраций ионов Zn^{2+} (0,02 – 200 мг/л), оптимальных для роста клеток и биосинтеза ЯК. Наибольшая продукция ЯК наблюдалась при концентрации ионов Zn^{2+} , равной 26 мг/л.

Таблица 2. Влияние ионов цинка на накопление биомассы и синтез ЯК дрожжами

	Zn^{2+} (мг/л)												
	0,02	0,1	0,2	0,4	1,0	5,0	10,0	20	26	50	75	200	300
<i>C. zeylanoides</i>													
Биомасса (г/л)	0,3	0,9	2,5	2,7	2,6	2,5	2,0	2,0	1,5	0,3	0,1	н.о.	н.о.
ЯК (г/л)	0	0	2,5	3,2	3,1	2,5	2,0	1,6	0,7	0	0	н.о.	н.о.
У _{ЯК} (%)	0	0	25	37	42	40	33	32	12	0	0	н.о.	н.о.
ЯК (г/г клеток)	0	0	1,0	1,2	1,2	1,0	1,0	0,8	0,5	0	0	н.о.	н.о.
<i>C. catenulata</i>													
Биомасса (г/л)	2,0	3,0	3,0	3,1	3,1	3,2	3,2	3,2	3,2	3,3	3,3	3,1	2,6
ЯК (г/л)	2,0	3,0	3,0	3,7	3,7	4,5	4,5	4,5	4,7	4,2	3,3	2,2	0
У _{ЯК} (%)	33	32	38	40	41	48	48	48	50	44	40	37	0
ЯК (г/г клеток)	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,4	1,4	1,4	1,5	1,3	1,0	0,7	0

Дрожжи выращивали в колбах в условиях лимитирования роста азотом 6 суток

Эти наблюдения, на наш взгляд, являются довольно убедительным примером особо важной роли цинка при выращивании дрожжей на этаноле, на которую следует обратить внимание при составлении минеральных сред и, особенно при масштабировании процесса получения ЯК.

При исследовании влияния аэрации на рост дрожжей *C. catenulata* и синтез ЯК было показано, что в условиях высокой аэрации среды (при культивировании в колбах с 50 мл среды) клетки синтезировали в 1,8 раза больше ЯК, чем в условиях с низким содержанием кислорода (100 мл) при малоизменяющейся плотности биомассы (табл. 3). При лимите кислорода в среде (200 мл) накопления ЯК не происходило. Таким образом, синтез ЯК у *C. catenulata* зависел от интенсивности аэрации культуры кислородом.

Таблица 3. Влияние аэрации на накопление биомассы и синтез ЯК у *C. catenulata*

Параметры	Объем среды в колбе (мл)		
	200	100	50
	Уровень кислорода в среде		
	0,24 ммоль O ₂ /л мин	0,3 ммоль O ₂ /л мин	0,56 ммоль O ₂ /л мин
Биомасса (г/л)	2,8	2,9	3,0
ЯК (г/л)	0	1,5	4,5
Y _{ЯК} (%)	0	26,0	50,0
ЯК (г/г клеток)	0	0,5	1,5

Дрожжи выращивали в колбах в условиях лимитирования роста азотом 6 суток

Результаты оптимизации условий роста и кислотообразования дрожжей *S. zealandica* и *C. catenulata* легли в основу эксперимента в условиях глубинного периодического культивирования в 10-ти л ферментере АНКУМ-2М с контролируемыми значениями температуры, pH и pO₂. Культивирование проводили в условиях высокой аэрации (pO₂ 55-60% от насыщения); содержание цинка (ZnSO₄·6H₂O) составляло 2,678 г/л для *C. catenulata* и 0,033 г/л для *S. zealandica*; концентрация сульфата аммония составляла 6 г/л. Этанол в среду культивирования вносили дробно по 1,0 г/л для *C. catenulata* и 3,0 г/л для *S. zealandica* по мере потребления. Данные о динамике роста, потребления азота и накопления ЯК и яблочной кислоты представлены на рис. 2.

В период активного роста клеток выделение ЯК в среду не наблюдалось. Экскреция ЯК начиналась в фазе замедления роста (после 15 ч) и при переходе клеток в стационарную фазу, вызванную истощением азота из среды; на 68 ч *C. catenulata* продуцировали 5,2 г/л, а *S. zealandica* - 9,4 г/л ЯК. Одновременно с ЯК накапливалась яблочная кислота в соотношении 1,3 : 1,0 для *C. catenulata* и 1,1 : 1,0 для *S. zealandica*, что делало продолжение процесса нецелесообразным.

Выход ЯК (Y_{ЯК}), характеризующий количество ЯК (г), образуемой при потреблении 100 г этанола, составлял 32,6% для *C. catenulata* и 39,0% для *S. zealandica*. Согласно литературным данным значение Y_{ЯК} у другого штамма *S. brumptii* IFO 0731– продуцента ЯК в среде с *n*-алканами составлял 67% (Sato et al., 1972).

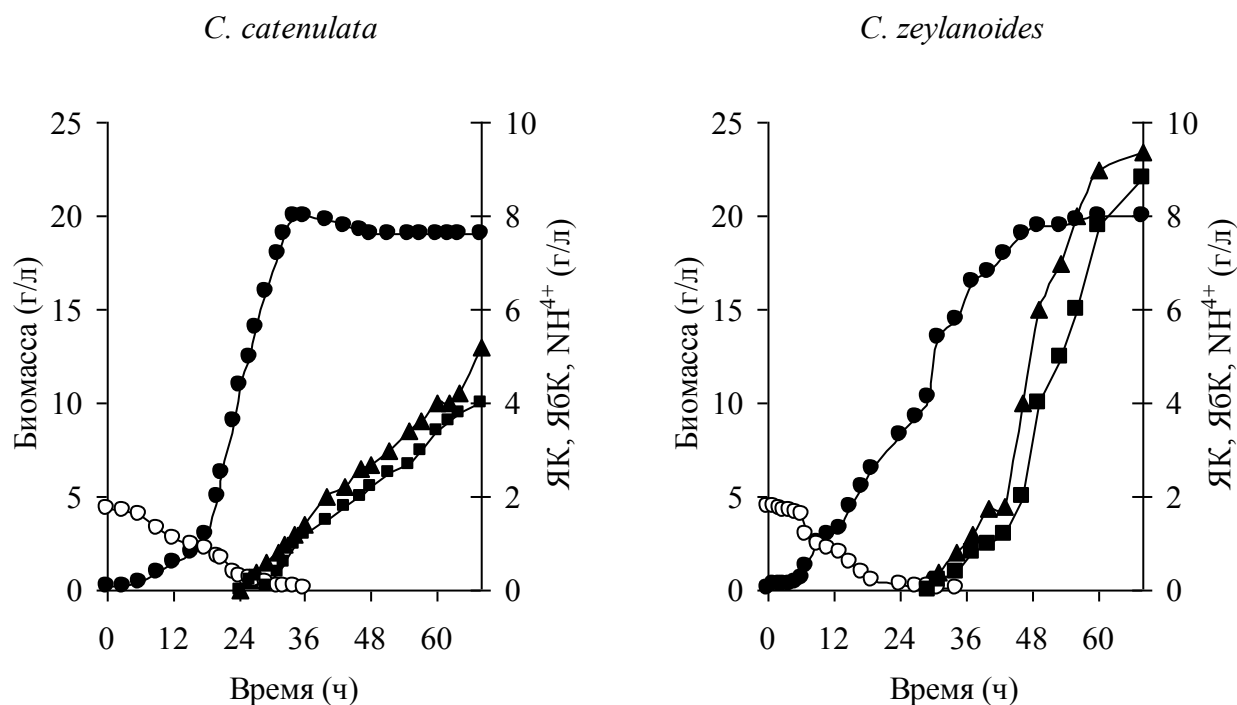


Рис. 2. Динамика роста (●), потребления сульфата аммония (○) и продукции ЯК (▲) и яблочной кислоты (■).

Данные, характеризующие эффективность процессов роста и синтеза ЯК у дрожжей *C. catenulata* и *C. zeylanoides* представлены в табл. 4. Выход клеток по массе ($Y_{X/S}$), характеризующий количество биомассы (г), образуемой при потреблении 100 г этанола, составлял 67% у *C. catenulata* и 63% у *C. zeylanoides*. Максимальная удельная скорость роста дрожжей (μ_{\max}) составляла $0,35 \text{ ч}^{-1}$ для *C. catenulata* и $0,31 \text{ ч}^{-1}$ для *C. zeylanoides*.

Однако, поскольку равные количества различных углеродных субстратов имеют разную энергетическую ёмкость, неправомерно сравнивать значения $Y_{\text{ЯК}}$, полученные при культивировании дрожжей на разных субстратах. Поэтому для оценки эффективности кислотообразования использовали также показатель энергетического выхода ЯК ($\eta_{\text{ЯК}}$). Параметр $\eta_{\text{ЯК}}$ характеризует долю энергии использованного субстрата (этанола), перешедшего в ЯК. Значение $\eta_{\text{ЯК}}$ вычисляли на основании теории материально-энергетического баланса (Minkevich, 1983; Erickson et al., 2000).

Таблица 4. Рост и биосинтез ЯК у дрожжей *C. catenulata* и *C. zeylanoides*

Параметры	<i>C. catenulata</i>	<i>C. zeylanoides</i>
Выход биомассы ($Y_{X/S}$) (%)	67,0	63,0
Максимальная удельная скорость роста (μ_{\max}) (ч^{-1})	0,35	0,31
ЯК (г/л)	5,2	9,4
Выход ЯК ($Y_{\text{ЯК}}$) (%)	32,6	39,0
Энергетический выход ($\eta_{\text{ЯК}}$) (%)	14,8	17,8
Яблочная кислота (г/л)	4,0	8,8
<i>threo</i> -D(S)-изолимонная кислота (г/л)	1,0	1,7

Значения $\eta_{\text{ЯК}}$ у *C. catenulata* и *C. zeylanoides* составили 14,8% и 17,8%, соответственно, и сопоставимы с величиной 18,7%, полученной для штамма *C. brumptii* IFO 0731 при росте на *n*-алканах (Sato et al., 1972).

3. Участие глиоксилатного цикла в биосинтезе ЯК из этанола

При росте на этаноле у дрожжей наряду с ЦТК активно функционирует глиоксилатный цикл (ГЛЦ), который предположительно может служить дополнительным источником образования ЯК в дрожжевой клетке.

С целью доказательства высокой значимости ГЛЦ в биосинтезе ЯК проведено определение активности ферментов ЦТК и ГЛЦ у *C. catenulata* в период роста (12 ч) и продукции ЯК (48 ч) (рис. 3). Установлено, что для дрожжей характерна высокая активность цитратсинтазы, особенно в условиях синтеза ЯК (3,45 Ед./ мг белка). Клетки *C. catenulata* в период роста и синтеза ЯК имели также высокую активность аконитат-гидратазы, осуществляющей взаимопревращения цитрата в изоцитрат.

В метаболизме изоцитрата могут принимать участие НАД- и НАДФ-зависимые изоцитратдегидрогеназы и изоцитрат-лиаза. НАД-изоцитратдегидрогеназа проявляла довольно низкую активность как в фазе роста, так и при синтезе ЯК (0,03 Ед./мг белка), НАДФ-зависимый фермент имел активность в 3 раза выше.

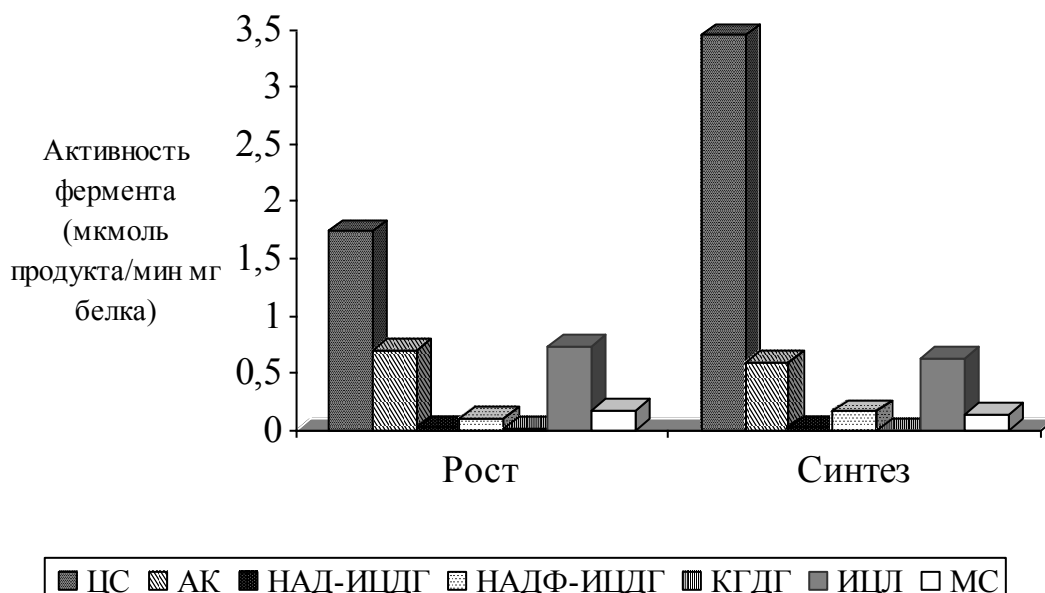


Рис. 3. Активности ферментов ЦТК и ГЛЦ у *C. catenulata* при росте на этаноле в условиях синтеза ЯК. Активности ферментов определяли в бесклеточных гомогенатах, содержащих ферменты, как цитоплазмы, так и митохондрий.

ЦС - цитратсинтаза, АК - аконитат-гидратаза, НАД- и НАДФ-ИЦДГ – изоцитратдегидрогеназа, КГДГ - кетоглутаратдегидрогеназа, ИЦЛ - изоцитрат-лиаза, МС - малат-синтаза.

Низкая активность НАД-изоцитратдегидрогеназы в ЦТК уже предполагает и низкую активность последующего фермента кетоглутаратдегидрогеназы (0,01 - 0,02 Ед./мг белка). Низкая активность НАД-изоцитратдегидрогеназы и кетоглутаратдегидрогеназы позволяют заключить, что эти ферменты не играют существенной роли в метаболизме этанола у *S. catenulata*, и по-видимому, сукцинат не может образовываться через ЦТК.

Одним из основных источников образования сукцината должна являться изоцитрат-лиазная реакция; действительно, активность изоцитрат-лиазы сохранялась на высоком уровне в экспоненциальной фазе и поддерживалась достаточно высокой в период синтеза ЯК (0,64 Ед./мг белка).

Дополнительным доводом в пользу предположения основной роли ГЛЦ в образовании ЯК явилось сравнительное изучение активности изоцитрат-лиазы у 11 штаммов дрожжей, способных к продукции ЯК на этаноле. Дрожжи культивировали в аэрируемых условиях на качалке в колбах с 50 мл среды при температуре 28-30 °С в условиях лимитирования роста азотом. Активность изоцитрат-лиазы определяли через 24 ч после перехода культуры в стационарную фазу в условиях синтеза ЯК. В качестве контроля использовали рост этих штаммов на глюкозе, когда синтез ЯК был незначительный (табл. 5). У всех штаммов при росте на этаноле активность изоцитрат-лиазы была существенно выше активности фермента у клеток, растущих на глюкозе.

Рассмотренные выше данные позволяют сделать заключение, что сверхсинтез ЯК у исследуемых дрожжей является результатом активного функционирования ГЛЦ на среде с этанолом.

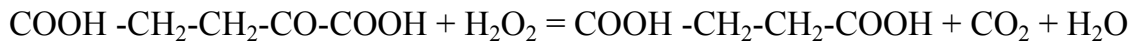
Таблица 5. Активность изоцитрат-лиазы при росте дрожжей на этаноле и глюкозе

Организм	Этанол		Глюкоза	
	ЯК (г/г)	Изоцитрат- лиаза (Ед./мг белка)	ЯК (г/г)	Изоцитрат- лиаза (Ед./мг белка)
<i>S. catenulata</i> ВКМ Y-5	1,50	0,640	0,05	0,036
<i>S. paludigena</i> ВКМ Y-2443	0,40	0,211	0,01	0,020
<i>S. utilis</i> ВКМ Y-74	0,42	0,423	0,02	0,019
<i>S. zeylanoides</i> ВКМ Y-6	0,50	0,650	0,01	0,050
<i>S. zeylanoides</i> ВКМ Y-2324	1,20	0,727	0,05	0,040
<i>S. zeylanoides</i> ВКМ Y-2595	0,43	0,560	0,02	0,030
<i>P. besseyi</i> ВКМ Y-2084	0,45	0,706	0,01	0,087
<i>P. guilliermondii</i> H-P-4	0,45	0,803	0,01	0,078
<i>P. inositovora</i> ВКМ Y-2494	0,38	0,700	0,01	0,078
<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-47	0,45	0,475	0,02	0,030
<i>Y. lipolytica</i> 69	0,50	0,500	0,02	0,028

4. Метод получения ЯК с использованием дрожжей *Y. lipolytica*

Поскольку при практическом получении ЯК из культуральной жидкости дрожжей *S. catenulata* и *S. zeylanoides* возникли затруднения с очисткой целевого продукта от других органических кислот, и оптимизация условий роста и состава питательной среды не позволила повысить продуктивность синтеза ЯК у исследуемых штаммов дрожжей, целью следующего раздела работы явилось изучение других подходов к получению ЯК с использованием дрожжей.

Известна химическая реакция декарбоксилирования КГК до ЯК под воздействием H_2O_2 и $KMnO_4$:



Сравнительно недавно показано, что декарбоксилирование КГК при окислительном стрессе в присутствии перекиси водорода приводит к образованию ЯК, которая затем активно окисляется в митохондриях (Fedotcheva et al., 2006). Данный процесс позволяет шунтировать ЦТК в условиях окислительного стресса.

Представляло интерес изучить возможность практического применения данной реакции декарбоксилирования КГК до ЯК в присутствии окислителя перекиси водорода для разработки микробиологического способа получения ЯК.

В рамках выполнения этой задачи был отобран штамм-продуцент КГК; проверена возможность проведения реакции декарбоксилирования КГК до ЯК в фильтрате культуральной жидкости, и разработан двухстадийный способ получения ЯК из этанола, включающий микробиологический синтез КГК тиаминнауксотрофными дрожжами *Y. lipolytica* и ее дальнейшее химическое окисление до ЯК под воздействием перекиси водорода.

Дрожжи вида *Y. lipolytica* были выбраны для получения КГК из-за отсутствия у них способности синтезировать пиримидиновую часть молекулы тиаминна. При дефиците тиаминна происходит резкое снижение активности α -кетоглутаратдегидрогеназы, содержащей тиаминпирофосфат в качестве кофактора, и в результате этого большая часть образующейся КГК выделяется из клетки в культуральную жидкость.

Среди изученных тиаминнауксотрофных дрожжей штамм *Y. lipolytica* 212 (ВКМ Y-2412) отобран как наиболее активный продуцент. На рис. 4 представлена динамика роста *Y. lipolytica* 212 и накопления КГК.

В первые сутки культивирования происходило размножение клеток и увеличение биомассы, после чего культура переходила в фазу замедления роста, вызванную истощением из среды тиаминна. В этот момент происходило начало синтеза КГК. После 6 суток скорость биосинтеза КГК заметно снижалась, и к концу культивирования (8 суток) в культуральной жидкости накапливалось 14,9 г/л (102 мМ/л) КГК.

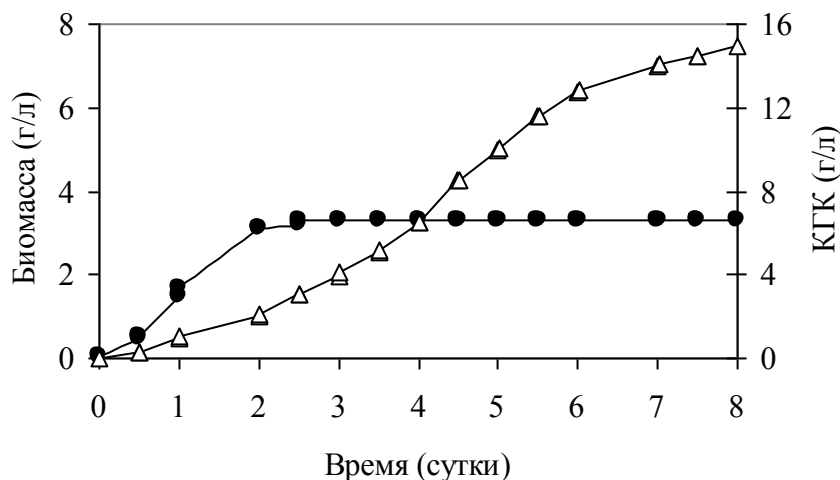


Рис. 4. Динамика роста дрожжей *Y. lipolytica* 212 (●) и образования КГК (Δ) в среде с этанолом.

Образец культуральной жидкости, содержащий КГК в концентрации 14,9 г/л (102 мМ/л), инкубировали в течение 1 ч в присутствии различных концентраций H_2O_2 . Сравнительный анализ HPLC-хроматограмм стандартных растворов ЯК и КГК (а), образцов культуральной жидкости до инкубации (б) и после инкубации в течение 1 ч в присутствии разных концентраций H_2O_2 (в, г) представлен на рис. 5. В культуральной жидкости до инкубации обнаружен только пик КГК (14,9 г/л; время 8,33 мин) (б), в то время как в присутствии 100 мМ/л H_2O_2 наряду с пиком КГК обнаруживается пик ЯК (время 9,73 мин) (в), т.е. при окислении 7,1 г/л (48 мМ/л) КГК образуется 3,39 г/л (29 мМ/л) ЯК.

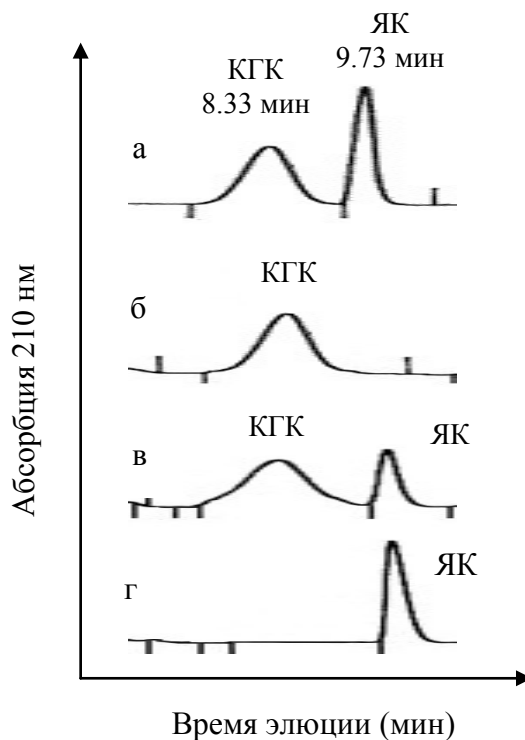


Рис. 5. Сравнительный анализ HPLC-хроматограмм стандартных растворов ЯК и КГК (а), образцов культуральной жидкости до инкубации (б) и после инкубации в течение 1 ч в присутствии разных концентраций H_2O_2 : 100 мМ/л H_2O_2 (в) и 560 мМ/л H_2O_2 (г).

При инкубации фильтрата культуральной жидкости с 560 мМ/л H_2O_2 в культуральной жидкости обнаружен только пик ЯК (время 9.73 мин) (г), т.е. наблюдается полное окисление 14,9 г/л (102 мМ/л) КГК до ЯК, концентрация которой составила 12 г/л (102 мМ/л).

Ниже приведены данные о динамике образования ЯК у *Y. lipolytica* 212 в присутствии H_2O_2 (рис. 6). Дрожжи выращивали в присутствии 100 мМ/л H_2O_2 , которая вносилась периодически и не ингибировала рост клеток. Увеличение концентрации H_2O_2 в среде до 750 мМ/л приводило к снижению жизнеспособности клеток на 50%, а при 1100 мМ/л H_2O_2 рост клеток был ингибирован (данные не представлены).

Культивирование дрожжей в присутствии 100 мМ/л H_2O_2 практически не влияло на рост продуцента, в то время как процесс кислотообразования был значительно изменен. Процесс в присутствии H_2O_2 шел с постоянной скоростью кислотообразования в течение длительного времени (8 сут), к концу культивирования концентрация ЯК составляла 16,4 г/л (140 мМ/л) ЯК.

Таким образом, в присутствии H_2O_2 эффективность образования ЯК увеличивалась на 37% с 12 г/л ЯК (при культивировании дрожжей без H_2O_2 и последующей обработки ею КГК до ЯК) до 16,4 г/л ЯК (при культивировании дрожжей в присутствии H_2O_2).

Процесс получения ЯК из КГК в среде с этанолом в присутствии H_2O_2 был проведен в 10-ти литровом ферментере АНКУМ-2М в условиях лимитирования роста клеток тиамином. В качестве контроля проводили культивирование дрожжей *Y. lipolytica* 212 без добавления H_2O_2 . При культивировании дрожжей *Y. lipolytica* 212 без добавления H_2O_2 (рис. 7а) на 8 суток культивирования концентрация КГК составляла 60,8 г/л (416 мМ/л). Содержание других органических кислот было незначительным. При обработке фильтрата культуральной жидкости с H_2O_2 концентрация ЯК составила 49,1 г/л (416 мМ/л).

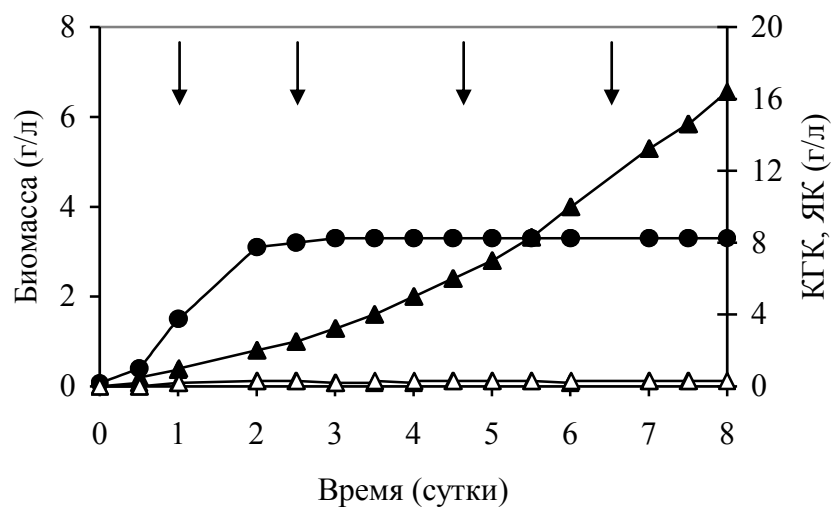


Рис. 6. Динамика роста (●), образования КГК (Δ) и ЯК (▲) у *Y. lipolytica* 212 в среде с этанолом в присутствии H_2O_2 . Стрелки указывают время добавления 100 мМ/л H_2O_2 (общее количество 400 мМ/л).

Культивирование дрожжей *Y. lipolytica* 212 в присутствии H_2O_2 не оказывало заметного влияния на накопление биомассы, однако процесс кислотообразования был более интенсивным (рис. 7б). В ходе культивирования в несколько приемов была внесена H_2O_2 (560 мМ/л), при которой происходило частичное окисление КГК до ЯК. На 8 сутки культивирования в присутствии H_2O_2 в культуральной жидкости накапливалось 60,8 г/л КГК и 14,3 г/л ЯК с незначительным содержанием других кислот.

Следует отметить, что имелись некоторые трудности с проведением процесса культивирования дрожжей в присутствии H_2O_2 (при окислении КГК до ЯК происходило образование углекислого газа и пенообразование), что с технологической точки зрения мешало проведению процесса в ферментёре. Поэтому дальнейшая работа по полному окислению КГК до ЯК проводилась уже в фильтрате культуральной жидкости, а не в ферментёре.

При инкубации фильтрата культуральной жидкости с H_2O_2 наблюдалось полное окисление 60,8 г/л (416 мМ/л) КГК до ЯК (на HPLC-хроматограмме обнаружен только пик ЯК); суммарная концентрация ЯК (14,3 г/л + 49,1 г/л) составила 63,4 г/л (537 мМ/л).

Таким образом, в данном разделе работы была показана принципиальная возможность получения ЯК из КГК при культивировании дрожжей *Y. lipolytica* 212 в присутствии H_2O_2 . Такой способ получения ЯК позволил повысить эффективность процесса на 29% (с 416 мМ/л до 537 мМ/л ЯК) в сравнении с культивированием дрожжей без H_2O_2 .

По-видимому, в отсутствие H_2O_2 накопление КГК в среде тормозит функционирование ЦТК и синтез КГК в этом цикле.

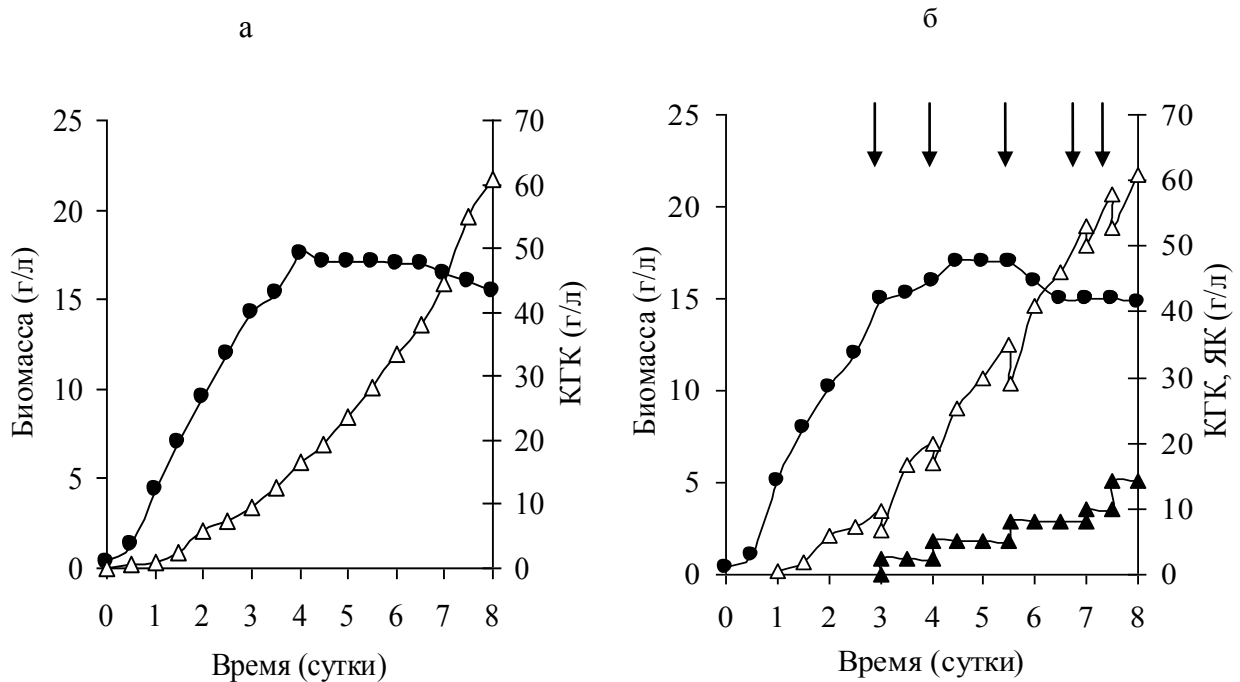


Рис. 7. Динамика роста (●) *Y. lipolytica* 212 и образования ЯК (▲) и КГК (Δ) без добавления перекиси водорода (а) и в присутствии перекиси водорода (б). Стрелками указано добавление H_2O_2 .

Показано ингибирование кетоглутаратом мультиферментного комплекса ЦТК цитратсинтаза/малатдегидрогеназа (Fahien et al., 1988). Процесс в присутствии H_2O_2 позволяет непрерывно удалять часть образующейся КГК и снимать ее ингибирующее воздействие на продуцент.

5. Выделение ЯК из пермеата и очистка до высокой чистоты

Разработанный метод выделения ЯК базировался на относительно хорошей растворимости этой кислоты в органических растворителях. Последовательность операций сводилась к разложению остаточных количеств перекиси водорода, обесцвечиванию нативного раствора, его подкислению минеральной кислотой и концентрированию. ЯК экстрагировали этанолом, спирт отгоняли и остаток перекристаллизовывали. Чистота получаемого продукта (процентное содержание ЯК в препарате) – 99,9%. Температура плавления 187-188 °С сопоставима с литературными данными (mp 185-191 °С, Fluka 2005/2006).

6. Сравнение биохимических свойств ЯК

Исходя из предположения, что ЯК, образуемая в результате декарбоксилирования КГК перекисью водорода, может отличаться по своим биохимическим свойствам от ЯК, образуемой в ЦТК, проверили влияние продукта на основные функции митохондрий. В качестве эталона применяли ЯК фирмы Sigma, обычно используемую в биохимических исследованиях. Сравнение двух препаратов проводили по таким параметрам, как АДФ-стимулируемое дыхание, поскольку АДФ обладает большим влиянием на скорость дыхания митохондрий по сравнению с субстратом; дыхательный контроль (изменение скорости дыхания с изменением концентрации АДФ) и чувствительность к малонату – ингибитору дыхания митохондрий.

В табл. 6 представлены параметры дыхания митохондрий печени крыс при использовании в качестве субстратов окисления коммерческой ЯК (Sigma) и ЯК, произведённой в ИБФМ в результате настоящей работы. Как видно из табл. 6, различия между ними минимальны в отношении скорости АДФ-стимулируемого дыхания (179,6 нг ат О/мин для коммерческой ЯК фирмы Sigma и 171,1 нг ат О/мин для ЯК, синтезируемой микробиологическим способом). Препарат ИБФМ имеет более высокий дыхательный контроль (на 8%) и большую чувствительность к малонату (на 29%).

Идентичность коммерческой ЯК (Sigma) и ЯК, произведенной в ИБФМ, подтверждается и данными по сравнению их влияния на мембранный потенциал митохондрий.

Таблица 6. Сравнение биохимических показателей ЯК

Параметры	ЯК (ИБФМ)	ЯК (Sigma)
Скорость дыхания (нг ат О/мин) при добавлении 0,2 мМ АДФ	171,1	179,6
Дыхательный контроль	3,9	3,6
% ингибирования малонатом (1мМ)	36,0	25,6

Этот метод позволяет тестировать более низкие концентрации субстрата и регистрировать сдвиги в степени энергизации митохондрий по изменению величины трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода $\Delta\mu_{H^+}$ на внутренней мембране митохондрий.

Величину мембранного потенциала оценивали по аккумуляции липофильного катиона тетрафенилфосфония (ТФФ⁺) с помощью ионселективного мембранного электрода. Сигнал с ТФФ⁺-чувствительного электрода через иономер поступал на регистрационный потенциометр. Ингибирование процесса дыхания проводили с помощью малоната и ротенона. Из рис. 8 видно, что оба препарата оказывали одинаковый эффект при равных концентрациях и малонат в равной степени ингибировал окисление обоих препаратов ЯК, снижая мембранный потенциал до одного и того же уровня.

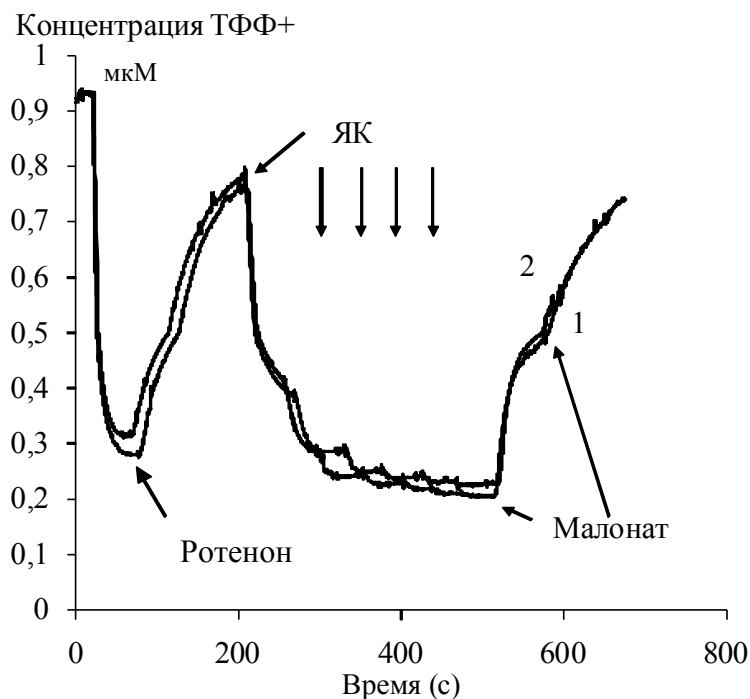


Рис. 8. Сравнение мембранного потенциала митохондрий при окислении ЯК (ИБФМ) (1) и коммерческой ЯК (Sigma) (2).

После снижения мембранного потенциала ротеноном при ингибировании эндогенного дыхания добавление ЯК по 50 мкМ приводило к градуальному повышению потенциала. Таким образом, при низких концентрациях ЯК различия между препаратами минимальны. Это означает, что ЯК, как продукт, образуемый окислением КГК перекисью водорода, транспортируется в митохондрии и эффективно окисляется сукцинатдегидрогеназой.

В итоге настоящей работы показана возможность практического получения ЯК из этанола при культивировании дрожжей; подобраны условия, обеспечивающие максимальную продукцию ЯК; разработан процесс получения и выделения ЯК; проведено испытание влияния полученного препарата на основные функции митохондрий. Полученный препарат ЯК может применяться в сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности, где предъявляются высокие требования к чистоте используемых продуктов.

ВЫВОДЫ

1. Установлена способность дрожжей различного таксономического положения синтезировать янтарную кислоту из этанола. Показано, что многие виды родов *Candida*, *Pichia*, *Yarrowia* образуют, наряду с другими органическими кислотами, янтарную кислоту в условиях лимитирования роста азотом. Наиболее активными продуцентами янтарной кислоты являлись штаммы *Candida zeylanoides* ВКМ Y-2324 и *Candida catenulata* ВКМ Y-5.

2. Показано, что условия культивирования продуцентов (концентрация растворенного кислорода, азота, этанола и ионов Zn^{2+}) определяют качественный и количественный состав экскретируемых веществ. Для продуцентов *C. zeylanoides* ВКМ Y-2324 и *C. catenulata* ВКМ Y-5 подобраны оптимальные условия для роста и синтеза янтарной кислоты: высокая аэрация среды; содержание этанола не выше 1,0 г/л для *C. catenulata* и 3,0 г/л для *C. zeylanoides*; повышенное содержание ионов цинка - 0,4 мг/л для *C. zeylanoides* и 26,0 мг/л для *C. catenulata*.

3. Показано, что сверхсинтез янтарной кислоты у *C. zeylanoides* ВКМ Y-2324 и *C. catenulata* ВКМ Y-5 обусловлен особенностью функционирования глиоксилатного цикла. В условиях лимитирования роста азотом сохраняется высокая активность ферментов цитратсинтазы, аконитат-гидратазы, и изоцитратлиазы, обеспечивающих образование ЯК.

4. Разработан двухстадийный способ получения янтарной кислоты из этанола, включающий микробиологический синтез α -кетоглутаровой кислоты тиаминнауксотрофными дрожжами *Yarrowia lipolytica* 212 (ВКМ Y-2412) и ее дальнейшее химическое декарбоксилирование до янтарной кислоты под воздействием перекиси водорода. Максимальная концентрация янтарной кислоты составила 63,4 г/л.

5. Разработан способ выделения янтарной кислоты, включающий стадии разложения остаточных количеств перекиси водорода, подкисления и концентрирования культуральной жидкости, экстракции янтарной кислоты этанолом и дальнейшей её перекристаллизации с целью очистки до высокой чистоты.

6. Высокое качество полученного препарата и его соответствие квалификации "biochemical grade" подтверждено результатами исследования его окисления митохондриями животных в сравнении с коммерческим препаратом фирмы Sigma.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Статьи в рецензируемых журналах**

1. **Юсупова А.И.**, Камзолова С.В., Козырева Т.М., Моргунов И.Г. Биосинтез янтарной кислоты дрожжами из этилового спирта // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2006. Т. 2. № 4, С. 7-13.
2. Kamzolova S.V., **Yusupova A.I.**, Vinokurova N.G., Fedotcheva N.I., Kondrashova M.N., Finogenova T.V., Morgunov I.G. Chemically assisted microbial production of succinic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol // Applied Microbiology and Biotechnology. 2009. V. 83. № 6. P. 1027-1034.
3. Kamzolova S.V., **Yusupova A.I.**, Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Kozyreva T.M. and Morgunov I.G. Succinic acid synthesis by ethanol-grown yeast // Food Technology and Biotechnology. 2009. V. 47. № 2. P. 144-152.
4. **Yusupova A.I.**, Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Morgunov I.G. Process for the production of succinic acid by *Yarrowia lipolytica* yeast // The FEBS Journal. 2010. V. 277. Suppl. 1. P. 303.

Статьи в научных сборниках и других изданиях

1. **Юсупова А.И.**, Камзолова С.В., Винокурова Н.Г., Козырева Т.М., Моргунов И.Г. Биосинтез янтарной кислоты микроорганизмами // Материалы VI Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 2008. С. 256-258.
2. **Юсупова А.И.**, Камзолова С.В. Скрининг дрожжевых организмов-продуцентов янтарной кислоты // Материалы Международной школы-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология», Москва – Пущино, 2008. С. 185-186.
3. **Юсупова А.И.**, Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Получение янтарной кислоты с использованием дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Материалы 12-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пущино, 2008. С. 235-236.
4. **Юсупова А.И.**, Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Биосинтез а-кетоглутаровой кислоты и янтарной кислоты из *n*-алканов у дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Материалы 12-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пущино, 2008. С. 236.
5. Камзолова С.В., **Юсупова А.И.**, Винокурова Н.Г., Федотчева Н.И., Кондрашова М.Н., Финогенова Т.В. Микробиологический способ получения янтарной кислоты // Материалы пятого съезда общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Москва, 2008. С. 65-66.

6. **Юсупова А.И.**, Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Фатыхова А.Р., Лунина Ю.Н. Микробиологический способ получения янтарной кислоты // Материалы российского молодёжного инновационного конвента, Москва, 2008. С. 70-71.
7. **Юсупова А.И.**, Моргунов И.Г. Влияние условий культивирования на рост *S. catenulata* ВКМ У-5 и *S. zeylanoides* ВКМ У-2324 – продуцентов янтарной кислоты // Материалы 14-ой Международной Пушкинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пушкино, 2010. С. 308-309.
8. **Юсупова А.И.**, Камзолова С.В., Винокурова Н.Г., Моргунов И.Г. Биосинтез янтарной кислоты из *n*-алканов // Материалы VII Международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 2010. С. 181-182.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне признательна сотрудникам, способствовавшим выполнению данной диссертационной работы: д.б.н. Кондрашовой М.Н., к.б.н. Федотчевой Н.И. (ИТЭБ РАН), д.б.н. Финогеновой Т.В., к.б.н. Дедюхиной Э.Г., Винокуровой Н.Г., к.б.н. Самойленко В.А., к.б.н. Чистяковой Т.И., Фетисову В.В., 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.