

## ОТЗЫВ

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

Диссертационная работа Ю.Н. Луниной выполнена в ИБФМ РАН в лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов, которая по праву считается одной из ведущих мировых исследовательских групп в данной области. Исследование направлено на достижение очень важной и актуальной цели: получению с помощью мутагенеза суперпродуцентов лимонной кислоты и изучению режимов оптимизации и биохимии этого процесса у дрожжей с использованием возобновляемого растительного сырья. В связи с этим можно говорить, что работа Юлии Николаевны представляет собой как практический, так и значительный теоретический интерес.

Диссертация построена по традиционной схеме, чётко организована и хорошо оформлена. Она занимает 127 страниц, иллюстрирована 21 рисунком и 26 таблицами. Список цитируемой литературы насчитывает 203 наименования.

Для любой исследовательской работы, а для диссертационной – особенно, важно соотношение планируемых исследований с сегодняшним состоянием проблемы. В связи с этим хочу отметить, что значительная часть проанализированной автором литературы является достаточно свежей, относящейся к последнему десятилетию. В обзоре литературы автор дал достаточно подробную картину современного состояния проблемы. Сначала были рассмотрены технологические и, отчасти, экономические аспекты глубокой переработки зерна в России и микробиологического получения органических кислот. Далее в логической последовательности анализируются современные представления о продуцентах лимонной кислоты, её свойствах и применении. Особое внимание было уделено условиям и механизму биосинтеза лимонной кислоты у дрожжей *Y. lipolytica*. Важно отметить, что в последнем абзаце обзора литературы, автор позиционирует место собственных исследований в рамках общемирового контекста проблемы.

Объектом исследований была выбрана культура дрожжей *Y. lipolytica* ВМК У-2373. Выбор данного штамма сделан был, конечно, не случайно, а в результате большой работы по скринингу среди 34 природных штаммов дрожжей родов *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и *Yarrowia* на максимальное накопление лимонной кислоты в культуральной среде на единицу массы дрожжей. Именно по этому параметру для всей последующей работы и был выбран *Y. lipolytica* ВМК У-2373. Кроме того, автор утверждает, ссылаясь на таблицу 11, что у этого штамма самое высокое отношение ЛК:ИЛК, хотя по таблице видно, что это не совсем так. У штаммов 212 и 585 этот показатель заметно выше. Далее для выполнения поставленных задач автор использовал комплекс хорошо апробированных методов. Были использованы все технологии и приёмы, необходимые для корректного культивирования дрожжей, были подобраны лимитирующие среды, при которых накопление ЛК было максимальным. Использование автором трёх технологических приёмов культивирования дрожжей: периодического, отъёмно-доливного и фильтрационного – является, на мой взгляд, несомненным достоинством работы. Применённые автором аналитические методы: определение концентрации глюкозы, органических кислот, ЛК химическим методом, ИЛК кислоты энзиматическим методом, содержания белка и измерения активности ферментов – являются адекватными и достаточными для выполнения поставленных задач. Однако, необходимо отметить, что описание методов измерения активности ферментов для диссертационной работы слишком лаконично, как и описание применённой автором статистической обработки экспериментальных данных.

Всю экспериментальную часть диссертации можно разделить на два крупных раздела, логически безупречно связанных между собой. Первый раздел автор посвятил получению мутантных штаммов с помощью физического (УФ-радиация) и химического (нитрозогуанидин) мутагенов, их комбинации и отбору продуцентов на твёрдой и жидкой средах. Полученные в результате одинарных мутагенезов 1500 колоний были подвергнуты скринингу на ацетатной и цитратных средах, из которых были отобраны 16 вариантов с отсутствием или

замедлением роста на этих средах. Последующий скрининг на твёрдой среде с мелом и бромкрезоловым зеленым и отбор в жидкой среде дали результаты, наиболее адекватные задачам данного исследования. Ещё более интересные данные были получены при двойном мутагенезе. Полученные таким способом 21 штамм, продуцировали преимущественно ЛК, хотя только немногие из них превосходили исходный штамм по накоплению ЛК на единицу биомассы. Таким образом, Юлии Николаевне в результате объёмной и кропотливой работы удалось получить достаточно большое количество мутантных штаммов, пригодных для дальнейшей работы.

Второй логический раздел посвящён физиолого-биохимическим исследованиям мутантного штамма №15, характеризующегося наибольшим синтезом ЛК (19,8 г л<sup>-1</sup>) и большой величиной отношения ЛК:ИЛК (11,62). Эти эксперименты проводили, выращивая дрожжи на трёх разных источниках углерода: глюкозе, рапсовом масле и ферментализате осины. Интересно, что при более однородных источниках углерода (глюкоза и рапсовом масле, что соответствует поступлению углерода через гликолиз и окисление жирных кислот, соответственно) синтез ЛК начинался только после исчерпания азота в культуральной среде, тогда как при композитном источнике углерода (ферментализат) синтез ЛК начинался задолго до полного исчерпания азота. Несомненно интересными являются результаты исследования активности ферментов ЦТК в диком штамме и мутанте №15 при выращивании их на углеводном и липидном углероде. При обоих источниках углерода активность аконитатгидратазы у мутанта в 5-10 раз меньше, чем у дикого типа, а цитрат-синтазы в 1,5-4 раза выше, что, по-видимому, и может являться основной причиной суперпродукции ЛК у мутанта.

Таким образом, наиболее важными достижениями рассматриваемого исследования можно признать получение высокопродуктивного мутантного штамма *Y. lipolytica* №15, который в среде с глюкозой синтезировал лимонную кислоту с продуктивностью 100 г л<sup>-1</sup>, а так же получение ЛК из рапсового масла с продуктивностью, превосходящей мировой уровень, - 175 г л<sup>-1</sup> ЛК и соотношением ЛК:ИЛК = 32.

Есть и некоторые замечания по рассматриваемой работе:

1. В некоторых разделах и подразделах экспериментальной части диссертации есть фрагменты (например Рис. 12), место которым в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.
2. В характеристике УФ-обработки не определена мощность падающей радиации с расстояния 10 см.
3. При измерении глюкозы надо бы назвать субстрат пероксидазной реакции (с.48).
4. С помощью селективного электрода проводился анализ содержания не азота, а аммония (с.51).

Материалы диссертации полностью опубликованы в ведущих отечественном и зарубежном научных изданиях, а также представлены на крупных научных форумах. Автореферат полно и адекватно отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения научных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор достоин присвоения учёной степени по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник группы экологии и физиологии фототрофных организмов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук

Подпись, число

 4 фев 2016

Любимов В.Ю.

Адрес: 142290, Российская Федерация, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 2.

E-mail: [lvyu99@mail.ru](mailto:lvyu99@mail.ru)

Телефон: +7(4967)732988

