

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

142290, Московская обл., г. Пушкино, просп. Науки, д. 5
Тел./факс: (495) 956-33-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru, <http://www.ibpm.ru>
ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОГРН 1025007771491

27.11.2015 № ИИ-03.4-3

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ:



Зам. директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина Российской академии наук,
д.б.н. РАН

А.А. Леонтьевский,

« 27 » ноября 2015 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН).

Диссертация Луниной Юлии Николаевны «Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого растительного сырья» выполнена в лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Федеральное агентство научных организаций.

В 2003 г. соискатель окончила Нижегородский государственный университет с присуждением квалификации биолог по специальности «биология».

В период подготовки диссертации и по настоящее время соискатель Лунина Ю.Н. работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Федеральное агентство научных организаций, в должности младшего научного сотрудника. Для подготовки диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук без освоения программ подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре (на безвозмездной основе) сроком с 21 апреля 2014 г. по 21 апреля 2018 г. согласно приказу № 27д от 22.04.2014 г. Лунина Ю.Н. была прикрепена к Федеральному государственному бюджетному учреждению науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук.

Экзамены кандидатского минимума по биотехнологии (в том числе бионанотехнологии) и истории и философии науки (биологические науки) сданы в 2010 году, по иностранному языку (английский) – в 2012 году.

Научный руководитель – доктор биологических наук Моргунов Игорь Григорьевич, заведующий лабораторией аэробного метаболизма микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук.

По результатам рассмотрения диссертации «Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого растительного сырья» принято следующее заключение:

Актуальность темы диссертационной работы Луниной Ю.Н. обусловлена тенденцией глубокой переработки возобновляемого растительного сырья (глюкозы, отходов природной древесины, зерновых культур и др.) в продукты с высокой стоимостью. Наибольший интерес имеется к лимонной кислоте, которой ежегодно в мире производится 1 млн. 600 тыс. тонн с годовым приростом производства 3-5% от существующего уровня.

Диссертационная работа Луниной Ю.Н. является законченным научным исследованием, научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения задач, имеющих существенное значение для развития фундаментальных представлений о закономерностях биосинтеза лимонной кислоты и создания научных основ технологии получения лимонной кислоты с помощью мутантных штаммов дрожжей *Y. lipolytica* из возобновляемого растительного сырья (глюкозы, растительных масел, глюкозо-содержащих субстратов ЛПК).

Личное участие соискателя в получении результатов состоит в выборе методик и подходов для решения задач исследования, непосредственном проведении экспериментов по получению мутантных штаммов, проверке их кислотообразующей активности, разработке способов культивирования продуцентов в режиме периодического и непрерывного культивирования, в обработке и интерпретации полученных результатов и подготовке основных публикаций по выполненной работе.

Достоверность результатов проведенных исследований, полученных соискателем, подтверждается тем, что в работе использованы современные микробиологические и биотехнологические методы, а также компьютерные методы обработки данных. Все измерения проведены на сертифицированном оборудовании.

Новизна проведенных исследований обусловлена тем, что был разработан эффективный метод получения и отбора мутантов – продуцентов лимонной кислоты из возобновляемых источников углерода (глюкозы, растительных масел, глюкозо-содержащих отходов ЛПК).

В результате обработки природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ У-2373 ультрафиолетовым облучением и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином, а также их комбинированным воздействием селекционированы мутанты с продуктивностью, превосходящей мировой уровень.

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.

Биосинтез лимонных кислот биохимически охарактеризован: преимущественный синтез лимонной кислоты у мутантов происходит вследствие высокой активности цитрат-синтазы и резко сниженной активности аконитат-гидратазы и НАД-изоцитрат-дегидрогеназы.

Практическая значимость полученных результатов обусловлена тем, что с применением селекционированного мутанта *Y. lipolytica* №15 в условиях периодического культивирования достигнута концентрация лимонной кислоты в среде с глюкозой, равная 100 г/л и в среде с рапсовым маслом - 175 г/л, что достаточно для реализации в промышленном масштабе. Показано, что высокопродуктивный мутант *Y. lipolytica* №15 отличается устойчивостью к синтезу продукта в течение длительного культивирования в режиме отъемов-доливов (1280 ч) и с

применением мембранного модуля (480 ч). Впервые показана возможность получения биомассы, обогащенной протеином и незаменимыми аминокислотами из глюкозо-содержащих отходов ЛПК.

Ценность научных работ соискателя состоит в том, что в них изложен высокоэффективный процесс получения мутантов, обладающих повышенной способностью к синтезу лимонной кислоты из возобновляемого растительного сырья. Впервые обнаружена способность дрожжей *Y. lipolytica* к сверхсинтезу лимонной кислоты из глюкозо-содержащих древесных отходов. Разработаны новые способы получения лимонной кислоты из глюкозы и растительных масел с продуктивностью, достаточной для реализации в промышленном масштабе. Для мутантов показана принципиальная возможность продолжительного активного биосинтеза лимонной кислоты с применением мембранного модуля и режима отъемов-доливов.

Диссертационная работа Луниной Ю.Н. соответствует специальности 03.01.06 - биотехнология, в том числе бионанотехнологии.

Основные результаты диссертации полностью опубликованы в работах соискателя: в пяти статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК, и в одиннадцати тезисах международных и российских конференций.

Список публикаций автора по теме диссертационной работы:

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. Vol. 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.
6. 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
7. 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 Ин-т микробиологии НАН Беларуси. С. 132-134.
8. 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.
9. Лунина Ю.Н., Пунтус И.Ф. Получение мутантных штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica* – продуцентов лимонной и изолимонной кислот. Сб. Тезисов 10-ой Пуцинской школы – конференции молодых ученых, посвященная 50-летию Пуцинского научного центра РАН. «Биология – наука XXI века». Пушино, 17-21 апреля 2006. С. 381

10. Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Особенности *Yarrowia lipolytica* N 15 – продуцента лимонной кислоты из глюкозы // Материалы 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пущино, 2007. С. 210.
11. 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.
12. 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. 2010. С. 124-125.
13. 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 Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». Пущино. 2010. С. 285-286.
14. 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.
15. 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 – Пущино, 14-17 ноября 2011. С. 43.
16. Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты из глюкозо-содержащих гидролизатов древесины // Первая Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Пущино: ИБФМ РАН. 2014. С. 134.

Диссертация «Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого растительного сырья» рассмотрена на заседании семинара лаборатории вторичных метаболитов, лаборатории микробной энзимологии, и лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН 08 октября 2015 года, и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология, в том числе бионанотехнологии, в диссертационном совете при ИБФМ РАН.

Заключение принято на заседании Ученого Совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, 26 ноября 2015 г., протокол № 5.

Зав. лабораторией вторичных метаболитов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук,
д.б.н.

А.Г. Козловский

Козловский А.Г.

