

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

УДК 579.663

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

© 2023 г. Д. А. Дементьев^{1, 2, *}, Ю. А. Рыбаков^{1, 2}, С. П. Синеокий^{1, 2}

¹Национальный Биоресурсный центр “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов”,
Научно исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: dmitry@dementiev-da.ru

Поступила в редакцию 01.11.2023 г.

После доработки 04.11.2023 г.

Принята к публикации 06.11.2023 г.

Биотехнологическое производство лимонной кислоты (ЛК) представляет собой один из крупнейших и быстрорастущих секторов биотехнологии на мировом рынке. Она производится в кристаллическом виде и виде солей цитратов, широко используется в пищевой промышленности, производстве бытовой химии и косметики, металлургии и нефтедобывающей отрасли. Глобальное производство этой кислоты превышает 2 млн. тонн в год и увеличивается, примерно, на 4% ежегодно. Традиционное биотехнологическое производство ЛК основано на использовании в качестве продуцента мицелиальных грибов *Aspergillus niger*. Описаны различные альтернативные продуценты ЛК, в т.ч. на основе дрожжей и бактерий, однако по экономическим показателям они уступают промышленным продуцентам *A. niger*. В качестве наиболее перспективных, экологичных и высокотехнологичных продуцентов ЛК рассматриваются штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Создание конкурентоспособных биотехнологий получения ЛК на основе дрожжей *Y. lipolytica* с использованием глюкозы в качестве источника углерода стало возможным благодаря изучению результатов генетического контроля транспорта и метаболизма ЛК в клетке.

Ключевые слова: *Aspergillus niger*, лимонная кислота. *Yarrowia lipolytica*

DOI: 10.56304/S023427582305006X

ВВЕДЕНИЕ

Лимонная кислота (ЛК) представляет собой слабую органическую кислоту, впервые выделенную Шееле в 1784 году. В соответствии с систематическим названием ИЮПАК (Международный союз теоретической и прикладной химии) она также называется 2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновой кислотой. ЛК, играющая важную роль в метаболизме аэробных организмов, обычно рассматривается как трехосновная кислота из-за наличия в ней трех карбоксильных групп. ЛК существует в виде бесцветного белого кристаллического порошка и практически не имеет запаха. Она может быть безводной ($C_6H_8O_7$) или в форме моногидрата ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), который более устойчив и применяется в пищевой и фармацевтической промышленности как добавка, регулятор кислотности и консервант. Моногидрат придает продуктам кислый вкус и используется для про-

дления их срока годности. Безводная ЛК, находит широкое применение в промышленности для создания химических соединений, включая пластики, растворители, синтетические волокна и лекарства, также может действовать как сухой реагент или катализатор в химических реакциях [1]. Помимо этого, ЛК широко используется в бытовой химии, сельском хозяйстве, металлургии, легкой промышленности, нефтедобычи и других областях.

С момента первого получения с помощью *A. niger* в XIX веке ежегодное мировое производство ЛК растет из-за широкого спектра ее применения. В настоящее время объем годового производства ЛК составляет более 2 млн. т, что делает ее одним из наиболее крупнотоннажных органических веществ получаемых биотехнологически [2, 3]. В основном предприятия по выпуску ЛК расположены в Китае, где в 2020 г. вырабатывалось около 80% от мирового рынка ЛК [4]. По объемам получения ЛК за Китаем следуют Нидерланды, США и Германия [5]. На территории Российской Федерации в настоящее время производство ЛК отсутствует. Единственное предприятие, занимавшееся в последние годы ее выпуском — “Цитробел”,

Список сокращений: AcCoA — ацетилкофермент А; AMP — аденозин монофосфат; AMPD — аденозин монофосфат дезаминаза; ЛК — лимонная кислота; ИЛК — изолимонная кислота; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот.

было закрыто в 2017 г. Основная часть поставок ЛК в Россию обеспечивается из Китая, доля которых составляет 98% от общего объема рынка РФ.

Широкое использование ЛК в значительной степени связано с ее высокими потребительскими свойствами и биобезопасностью (статус GRAS — Generally Recognized as Safe) [6]. ЛК рекомендована международными экспертными органами для использования в пищевой и фармацевтической промышленности.

Традиционно, для крупнотоннажного промышленного производства ЛК используются различные технологии на основе штаммов-продуцентов мицелиальных грибов *A. niger* с применением в качестве субстратов различного доступного сахаросодержащего сырья — в т.ч. мелассы (сахарной или тростниковой), гидролизатов крахмала или глюкозной патоки. Известны технологии, основанные как на твердофазном, так и на глубинном культивировании *A. niger*. Недостатки связаны в основном с низкой экологичностью технологий и сложностью ферментации.

Большой и растущий внутренний рынок ЛК в РФ, широкие возможности расширения сырьевой базы, связанные с быстрым увеличением объемов глубокой переработки зерна пшеницы и кукурузы и получением глюкозной патоки — наиболее распространенного сырья в промышленной биотехнологии, определяют интерес к организации крупномасштабного производства ЛК в России с применением перспективных и конкурентоспособных технологий.

ПРОИЗВОДСТВО ЛК ШТАММАМИ *A. niger*

Для промышленного производства ЛК на основе *A. niger* используют три способа ферментации: поверхностную, твердофазную (также известную как процесс Коджи) и глубинное культивирование. Наиболее распространены два последних метода [7]. Их принципиальные отличия при производстве ЛК заключаются в следующем. При твердофазном культивировании *A. niger* выращивается на поверхности пористого твердого материала (например, отруби, картофель и др.) пропитанного средой. Этот метод позволяет использовать разнообразные дешевые субстраты, на поверхности которых грибок формирует биопленку или колонии, растет и синтезирует ЛК. Этот подход позволяет имитировать естественные условия роста грибов и создавать специфические микроклиматические условия для более эффективной продукции [2]. По завершении культивационного процесса биопленку или колонии грибов с поверхности твердой среды можно удалить с помощью фильтрации. Это помогает избавиться от большей части субстрата и остаточных клеток грибов. Для извлечения ЛК

используют воду и органические растворители, а также другие экстрагирующие агенты [8].

Наибольшее распространение процессы получения ЛК с использованием твердофазной ферментации получили в Китае, однако в последние годы они практически вытеснены более экологичными технологиями на основе глубинной ферментации.

Поскольку грибы распространяются и развиваются на поверхности твердой среды пространственные ограничения не позволяют увеличивать масштаб производства. Кроме того, необходимы большие затраты на техническое обслуживание, а низкая экологичность технологии связана трудностью предотвращения распространения в окружающую среду грибных спор, способных вызывать респираторные заболевания, в т.ч. аспергилез, особенно среди людей с ослабленной иммунной системой [9].

Избежать недостатков твердофазной ферментации в значительной степени удастся при использовании технологий глубинной ферментации *A. niger*, которая осуществляется в жидкой среде в биореакторах. Этот метод обеспечивает более легкий контроль над условиями роста и метаболизма гриба, включая кислородное обогащение, перемешивание жидкой среды, регулирование температуры и pH среды [2]. Достижимые технологические показатели масштабируемых технологий, основанных на глубинной ферментации *A. niger*, приведены в табл 1.

По завершении ферментации, клетки *A. niger* отделяют от жидкой среды фильтрованием или осаждением центрифугированием. Полученная жидкая фракция, обогащенная ЛК, затем может подвергнуться дополнительной очистке с использованием различных методов, таких как экстракция, хроматография или дистилляция.

Производство ЛК с использованием глубинной ферментации гриба *A. niger* основано на применении сахарной мелассы, широко распространено, однако имеет некоторые недостатки. Этот процесс состоит из нескольких этапов, требует предобработки сырья с целью снижения концентрации металлов, ингибирующих биосинтез ЛК [10], ограничен доступом к сырью, а также сопровождается неблагоприятным влиянием на окружающую среду из-за накопления больших объемов как твердых, так и жидких отходов [1].

Учитывая масштабы производства ЛК на основе использования *A. niger*, многочисленные исследования были направлены как на совершенствование штаммов продуцентов этого микроорганизма, так и технологий глубинной ферментации. В период 1980–2000 гг. наблюдался наибольший прогресс в этих исследованиях, результатом которых стало снижение удельного расхода мелассы с 4 до 2.5–3.5 т. для получения 1 т. ЛК за счет внедрения

Таблица 1. Примеры биосинтеза ЛК (г/л) *A. niger* при глубоинной ферментации
Table 1. Examples of LA biosynthesis (g/L) of *A. niger* during submerged fermentation

Субстрат	Уровни накопления ЛК (г/л)	Объем биореактора (л)	Скорость синтеза ЛК (г/л/ч)	Ссылка
Кукурузный гидролизат	187.7	50	3.13	[11]
Кукурузный гидролизат	185.7	30	2.58	[12]
Кукурузная мука сжиженная	173.2	24	3.15	[13]
Экстракт пшеничных отрубей	162.7	1	2.26	[14]
Кукурузный гидролизат	151.7	30	1.58	[15]
Гидролизат маниоки	141.5	5	1.97	[16]

новых штаммов и усовершенствованных технологий. Максимальный съем ЛК с 1 м³ объема ферментера на мелассных средах вырос в период с 1981—1998 гг. с 7.3 до 12.0 кг/(м³-сут.), что приближается к теоретическому максимуму, при котором 1 моль ЛК образуется из 1 моль глюкозы или 1.07 г ЛК/г глюкозы, с учетом того что в мелассе доля сахаров составляет около 50%. Эту теоретическую конверсию можно достичь, когда все доступные ресурсы используются исключительно для производства ЛК, а не для роста микроорганизма [17]. Период промышленных ферментаций обычно составляет 7—9 дней, а уровень накопления ЛК в культуральной среде около 140—150 г/л, при накоплении сухой биомассы около 10—15 г/л [18]. При увеличении длительности ферментации для достижения более высоких концентраций ЛК в культуральной среде уровень конверсии глюкозы в целевой продукт может снижаться. На накопление ЛК существенно влияет состав среды, особенно в процессах глубоинной ферментации. Было показано, что основными факторами, влияющими на ферментацию ЛК, являются тип и концентрация источника углерода, ограничение содержания азота и фосфатов, pH, аэрация, концентрация микроэлементов и морфология микроорганизма-продуцента [2].

После инокуляции на стадии прорастания грибковых спор в ферментационной среде требуется значение pH выше 5 [19]. Для упрощения извлечения ЛК на этой стадии pH должен быть ниже 2. В такой кислой среде ингибируется образование нежелательных продуктов, таких как щавелевая и глюконовая кислоты, а также снижается возможность заражения другими микроорганизмами [2].

Было обнаружено, что ионы двухвалентных металлов играют очень важную роль в получении ЛК, а также в росте *A. niger* [20]. Наиболее значимыми для образования ЛК являются Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ и Mn²⁺, существенно влияют на ее аккумуляцию в *A. niger* некоторые другие микроэлементы, такие как никель, молибден и кобальт [8]. Причем как понижение, так и превышение оптимальных концентраций этих ионов приводит к существенному сни-

жению биосинтеза ЛК, и необходим постоянный контроль и регулирование их концентрации как в используемом сырье, так и в ходе ферментации.

Для получения более продуктивных штаммов *A. niger* использовалась, в основном, селекция [21], но для совершенствования продуцентов описаны и генно-инженерные подходы. В частности, направленное снижение экспрессии гена хитинсинтазы *chsC* позволило сократить долю дисперсного мицеллия, что привело к уменьшению вязкости культуральной жидкости и последующему повышению эффективности аэрации и массообмена и в конечном итоге увеличило накопление ЛК [22].

При использовании осахаренного кукурузного крахмала в качестве субстрата для клеток *A. niger*, для увеличения конверсии глюкозы в ЛК, было обнаружено, что инактивация гена альфа-глюкозидазы (*agdA*) и усиление экспрессии гена глюкоамилазы (*GlaA*) приводят к снижению концентрации изомальтозы, и увеличению эффективности гидролиза крахмала. Это в свою очередь привело к повышению выхода ЛК, и конверсия сахара превысила 96% от теоретического максимума [12].

Было также описано снижение содержания остаточного сахара и увеличение выхода ЛК при инактивации у *A. niger* генов глюкозилтрансферазы [23], а также гена *acI1*, который отвечает за синтез АТФ-цитратлиазы [24].

Важным результатом исследований *A. niger* было, в частности, обнаружение и выявление важной роли в биосинтезе ЛК ее митохондриального транспортера *AnYhm2* [25] и экспортера из клетки *AnCexA* [19, 26].

Yarrowia lipolytica как продуцент ЛК

Для повышения технологичности и экологической устойчивости процессов получения ЛК длительное время проводятся исследования, направленные на разработку технологий, основанных на использовании в качестве продуцентов дрожжевых микроорганизмов.

Природные продуценты ЛК такие как *Y. lipolytica*, способны обеспечить высокую производитель-

Таблица 2. Примеры влияния генетических модификаций биосинтеза ЛК (г/л) *Y. lipolytica* на различных субстратах
Table 2. Examples of the influence of genetic modifications of LA biosynthesis (g/L) of *Y. lipolytica* on various substrates

Штамм и модификация	Субстрат	Уровни накопления ЛК (г/л)	Уровни накопления ИЛК (г/л)	Объем биореактора (л)	Скорость синтеза ЛК (г/л/ч)	Ссылка
<i>W29 [YIAMPD YIYhm2]</i>	Глюкоза	97.1	6.0	3	0.93	[33]
<i>wild type W29</i>		73.2	8.5		0.92	
<i>W29 [YIAMPD ΔYlyhm2 YISfc1]</i>	Глюкоза	7.4	136.7	3	1.39	[35]
<i>DSM 21175 [Cex1]</i>	Глицерин	9.2	2.49	1.2		[36]
<i>DSM 21175</i>		2.3	1.03			
<i>SWJ-1b [Inu1 del acl1 Icl1]</i>	Инулин	84	1.8	2		[38]
<i>SWJ-1b [Inu1]</i>		68.9	4.1			
<i>NG40/UV7</i>	Глицерин	115	4.6	10	0.8	[39]
<i>AWG7 Inu 8</i>	Инулин	75.5	1.5	5	0.8	[40]
<i>AWG7</i>	Фруктоза	48.7	2.0		0.42	
<i>AWG7</i>	Глюкоза	72.9	2.5		0.83	

ность и в сравнении с технологиями на основе грибов, использование дрожжей обладает несколькими важными преимуществами. Технологичность этих дрожжей связана с отсутствием спорообразования, устойчивостью к высоким концентрациям субстрата, а также устойчивостью синтеза ЛК к присутствию ионов металлов. Перспективность разработки промышленных продуцентов ЛК на основе дрожжей в значительной степени связана с гораздо более легкой методологией генетической модификации [1], что открывает новые возможности для повышения эффективности технологий получения ЛК на основе использования метаболической инженерии.

Y. lipolytica — аскомицетные гетероталлические диморфные дрожжи, не способные к брожению. От условий роста зависит то, какой формы они будут: клетки, гифы или псевдогифы. Со способностью метаболизировать субстраты, которые содержат н-парафины и масла, связано видовое название этих дрожжей — “*lipolytica*” [27]. Природная среда обитания для них — выбросы нефти, пищевые продукты, такие как сыр, кефир, йогурт, мясо, соя и др. В качестве источников углерода эти дрожжи могут эффективно использовать различные субстраты, включая различные жиры, глицерин, этанол, ацетат, глюкозу, сахарозу или инулин (при некоторых генетических модификациях) [1]. Геномная последовательность *Y. lipolytica* свидетельствует об их родстве с *Saccharomyces cerevisiae* [28, 29]. Многие штаммы *Y. lipolytica* доступны в различных коллекциях (например, ВКПМ, ВКМ). В настоящее время для разработки продуцентов ЛК различными группами исследователей используются несколько линий дрожжей выделенных

в разных странах: *H222* (Германия), *W29* (Франция), *CBS6124-2* (США) [27].

Актуальность производства ЛК в России на основе использования глюкозы (глюкозной патоки), связана с увеличением масштабов глубокой переработки зерна пшеницы и кукурузы, позволяющих производить большие количества растительного белка для применения в кормовой и пищевой промышленности, а также расширением производства глюкозной патоки, основным потребителем которой может являться крупнотоннажная промышленная биотехнология.

Для производства ЛК в РФ могут рассматриваться как распространенные технологии на основе *A. niger*, так и перспективные на основе дрожжей *Y. lipolytica*, при условии сопоставимости экономических показателей. Примеры результатов ферментаций ЛК с использованием различных штаммов *Y. lipolytica* приведены в табл. 2.

Метаболизм ЛК в дрожжах *Y. lipolytica* непосредственно связан с синтезом жиров. В цитозоле при синтезе жиров необходимый предшественник, ацетил-КоА (AcCoA), получается из ЛК, которая синтезируется в митохондриях и транспортируется в цитозоль [30]. Ранее проведенные исследования по разработке технологий получения ЛК на основе *Y. lipolytica* показали, что значительные уровни накопления ЛК достигаются при использовании в качестве субстратов растительных масел, глицерина и этанола [3]. Более предпочтительным источником углерода для *Y. lipolytica*, является глицерин, так как он участвует в синтезе липидов [31]. Применение этих субстратов позволяет накапливать AcCoA непосредственно в цитозоле, при этом образование ЛК усиливается

при нейтральных рН, а липидов – при более кислых [32].

Новые возможности в применении *Y. lipolytica* для производства ЛК из глюкозы появились после обнаружения митохондриального транспортера ЛК *YlYhm2*, ответственного за транспорт ЛК из митохондрии в цитозоль [33]. Усиление активности этого транспортера позволяет существенно увеличить накопление ЛК при использовании глюкозы в качестве источника углерода и открывает новые перспективы для разработки конкурентоспособных промышленных технологий производства ЛК на основе *Y. lipolytica*.

Дополнительное усиление биосинтеза ЛК продемонстрировано при комбинации модификаций, приводящих к усилению синтеза митохондриального транспортера *YlYhm2* и добавления одной копии гена аденозин монофосфат дезаминазы *YlAMPD* [33], аллостерического активатора митохондриальной изоцитрат дегидрогеназы регулирующего накопление в митохондриях ЛК и изолимонной кислоты (ИЛК). Эффективность данной конструкции представлена в табл. 2.

Когда источник азота заканчивается в среде, ключевой промежуточный продукт, цитрат, преобразуется в АсСоА с помощью фермента АТФ-цитратлиаза (*ACL*) для накопления липидов. Но даже несмотря на расход цитрата, его большая часть также выделяется в культуральную среду [32].

При использовании глюкозы в качестве источника углерода, цитрат выходит из митохондрии в обмен на α -кетоглутарат благодаря гену *YlYhm2*. Однако α -кетоглутарат, в свою очередь, покидает митохондрию и вступает в обмен на малат благодаря гену *YlOdc*. Ген *YlYhm2* в митохондриях работает в обе стороны, но при избытке глюкозы, он действует как транспортер цитрата из митохондрии. В то время как, при использовании цитрата в качестве источника углерода, ген *YlYhm2* начинает работать уже в обратную сторону, возвращая цитрат из цитозоля в митохондрию. Однако, когда глюкоза заканчивается, и в митохондриях накапливается много цитрата, он может транспортироваться обратно. Но важно учесть, что при высоком соотношении содержания углерода к азоту (С/Н) в митохондриях, возникает блок в цикле Кребса, и цитрат начинает накапливаться, выходя в цитозоль [33, 35].

Для конструирования продуцентов ЛК на основе *Y. lipolytica* могут быть использованы результаты исследований других природных продуцентов ЛК. Так предполагается, что для биосинтеза ЛК может быть важно увеличение активности мембранного транспортера ЛК дрожжей *Y. lipolytica* [33]. Предположительно эту функцию выполняет ген *A. niger* YA-LI0F03751 (*AnCexA*), гомологичный недавно выявленному и изученному мембранному транспортеру ЛК у *Y. lipolytica* ген

YALI0D20196g (*YlCex1*) [36]. Эффективность данного транспортера представлена в табл. 2.

Перспективы повышения технологических показателей связаны как с введением дополнительных генетических модификаций в конструируемые продуценты, усиливающих биосинтез ЛК, так и с оптимизацией процесса ферментации полученных штаммов- продуцентов. Актуальной задачей для создания промышленных продуцентов ЛК на основе *Y. lipolytica* является не только увеличение показателей скорости синтеза, накопления и конверсии, но и снижение уровня сопряженного синтеза ИЛК, существенно осложняющего процесс кристаллизации ЛК на этапе ее выделения [37].

Важно отметить, что наряду с выявлением митохондриального транспортера ЛК недавно было установлено, что транспорт из митохондрии ИЛК в *Y. lipolytica* контролирует ген *YlSfc1*, имеющий значительную гомологию с геном *ScSfc1 S. cerevisiae*, ответственного за митохондриальный транспорт янтарной и фумаровой кислот [35]. В случае инактивации активности АТФ-цитратлиазы (*acl1*) в штамме дрожжей *Y. lipolytica* *SWJ-1b* и сверхэкспрессии гена изоцитратлиазы (*Icl1*), который катализирует превращение ИЛК в АсСоА и оксалоацетат, может дополнительно увеличиться производство ЛК, уменьшив образование ИЛК в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) [38]. Регулирование активности этих транспортеров позволяет с одной стороны снизить нежелательное накопление ИЛК при биосинтезе ЛК, а с другой – создать эффективный продуцент ИЛК, использование которого может существенно снизить себестоимость получения этого промышленно-ценного продукта. Наглядные результаты по синтезу ЛК и ИЛК представлены в табл. 2.

Будет некорректным сравнивать продукцию ЛК в табл. 1 и 2, поскольку во второй представлены результаты, полученные при неоптимизированных условиях культивирования различных штаммов и модификаций. Однако, следует отметить, что в данной таблице есть исключение – результаты культивирования штамма NG40/UV7 [40], при оптимальных условиях, которые обеспечивают максимальную скорость биосинтеза ЛК, используя глицерин в качестве субстрата. Несмотря на то, что средняя конверсия перечисленных штаммов в зависимости от субстрата варьируется от 0.5 до 0.75 г/г согласно данным табл. 2, даже эти результаты позволяют увидеть потенциал *Y. lipolytica* в качестве производителя ЛК. При комбинировании нескольких модификаций и оптимизации условий культивирования можно достичь впечатляющих результатов.

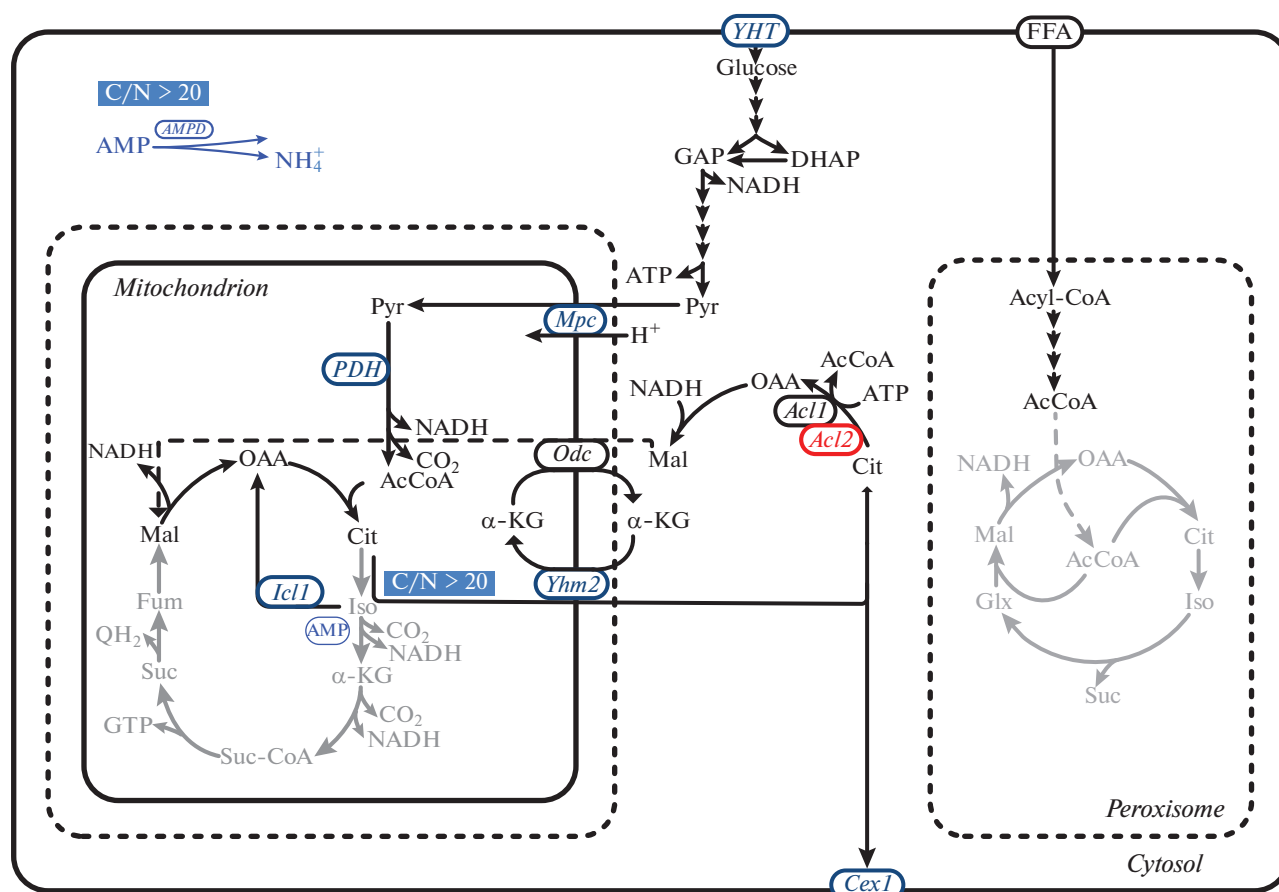


Рис. 1. Предложенные механизмы синтеза цитрата *Y. lipolytica* при азотном голодании с глюкозой в качестве источника углерода (Дополненная схема из статьи [35]). Введенные модификации, которые могут повысить продукцию цитрата отмечены синим, а делеция красным. ACL—АТФ-цитратлиаза; GAP—глицеральдегид-3-фосфат; DHAP—дигидроксиацетонфосфат; Puv—пируват; AcCoA—ацетил-CoA; OAA—оксалоацетат; Cit—цитрат; FFA—свободные жирные кислоты; Iso—изоцитрат; Icl—изоцитратлиаза; α -KG— α -кетоглутарат; Suc-CoA—сукцинил-CoA; Suc—сукцинат; Fum—фумарат; Mal—малат; Acet—ацетат; Acoyl-CoA—Ацил-CoA; Glx—глиоксилат. PDH—омплекс пируватдегидрогеназы; Mpc—митохондриальный переносчик пирувата; Yhm2—митохондриальный переносчик цитрата-оксоглутарата; Cex1—переносчик цитрата из клетки.

Fig. 1. Mechanisms for citrate synthesis in *Y. lipolytica* under nitrogen starvation with glucose as the carbon source are proposed (Augmented scheme from article [35]). Introduced modifications that could enhance citrate production are highlighted in blue, while deletions are indicated in red. ACL—ATP-Citrate lyase; GAP—glyceraldehyde 3-phosphate; DHAP—dihydroxyacetone phosphate; Pyr—pyruvate; AcCoA—acetyl-CoA; OAA—oxaloacetate; Cit—citrate; FFA—free fatty acids; Iso—isocitrate; Icl—Isocitrate lyase; α -KG: α -ketoglutarate; Suc-CoA: succinyl-CoA; Suc: succinate; Fum—fumarate; Mal: malate; Acet—acetate; Acyl-CoA—acyl-CoA; Glx—glyoxylate; PDH—pyruvate dehydrogenase complex; Mpc—mitochondrial pyruvate carrier; Odc—mitochondrial oxodicarboxylate carrier; Yhm2—mitochondrial citrate-oxoglutarate carrier; Cex1—citrate carrier from the cell.

Стратегия увеличения продукции ЛК в *Y. lipolytica*

Дальнейшие перспективы совершенствования способа получения ЛК на основе дрожжей *Y. lipolytica* связаны с использованием результатов последних лет в изучении генетического контроля метаболизма ЛК для повышения технологических характеристик штамма продуцента, а также с оптимизацией процесса ферментации с использованием доступных источников углерода.

К наиболее перспективным для создания промышленных продуцентов генетическим модификациям, которые представлены на рис. 1, можно отнести усиление митохондриального транспор-

та ЛК (ген *Y1Yhm2*); усиление дезаминирования аденозина (ген *Y1AMPD*) [33]; усиление транспорта ЛК из клетки (ген *Y1Cex1*) [36]; усиление транспорта глюкозы (гены *Yht1* и *Yht4*) [41]; усиление митохондриального переносчика пирувата (ген *MPC*) [42]; а так же усиление митохондриального синтеза АсСоА, ген пируватдегидрогеназы (*PDH*) [43].

Снижения уровня синтеза побочного продукта ИЛК и усиления синтеза ЛК в ЦТК можно добиться за счет усиления активности изоцитратлиазы (ген *Icl1*), который катализирует в митохондриях расщепление изоцитрата до сукцината и оксалоацетата. Для повышения синтеза ЛК можно

также снизить активность АТФ-цитратлиазы *acI1*, катализирующей в цитозоле превращение ЛК в АсСоА и оксалоацетат [38]. При этом дополнительным источником АсСоА, требующегося для синтеза клеточных липидов, может быть его пероксисомный синтез, при использовании наряду с глюкозой в качестве дополнительного источника углерода доступных растительных жиров [44].

Значимость ЛК невозможно недооценить, и обеспечение России собственным производством этого продукта не только приносит стране экономическую выгоду, но также укрепляет ее независимость и безопасность.

Среди достоинств технологий, основанных на использовании гриба *A. niger*, следует выделить высокую производительность и возможность использования различных дешевых сахаросодержащих субстратов, особенно для твердофазного культивирования. Однако, недостатки связаны, главным образом, с низкой экологичностью технологий и сложностью процесса ферментации.

В сравнении с грибами *A. niger*, конкурирующими в данной области, находятся дрожжи *Y. lipolytica*. Однако, дрожжевые штаммы-продуценты, полученные путем селекции, оказывались не конкурентоспособными по сравнению с *A. niger*, при использовании в качестве источника углерода сахаров, в частности, более экономически выгодного и доступного для крупнотоннажной биотехнологии субстрата — глюкозной патоки, получаемой при глубокой переработке зерна и кукурузы.

С разработкой эффективной методологии генетической и метаболической инженерии на основе результатов исследований генетического контроля транспорта и метаболизма ЛК в клетке, можно создать более перспективный продуцент, способный как увеличить производство ЛК, так и избавиться от недостатков, характерных для грибов *A. niger*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” — Биоресурсный центр “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов” НИЦ “Курчатовский институт”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Статья написана Д.А. Дементьевым и его текст прочитан, отредактирован и одобрен всеми авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cavallo E., Charreau H., Cerrutti P., Foresti M.L. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. *FEMS Yeast Res.*, 2017, 17(8). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox084>
2. Max B., Salgado J.M., Rodríguez N., Cortés S., Converti A., Domínguez J.M. Biotechnological production of citric acid. *Braz. J. Microbiol.*, 2010, 41, 862–875. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400005>
3. Gonçalves F.A.G., Colen G., Takahashi J.A. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *Sci. World J.*, 2014, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/476207>
4. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast on different renewable raw materials. *Fermentation. MDPI*, 2018, 4(2), 36. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020036>
5. Amato A., Becci A., Beolchini F. Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2020, 40(2), 199–212. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1709799>
6. Groenewald M., Boekhout T., Neuvéglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W., Wyss M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2014, 40(3), 187–206. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386>
7. Swain M.R., Ray R.C., Patra J.K. Citric acid: microbial production and applications in food and pharmaceutical industries. In: *Citric Acid* Ed. D. A. Vargis. 2011 Nova Science Publishers, Inc. ISBN 978-1-62100-353-3 <https://www.researchgate.net/publication/236894915>
8. Behera B.C. Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2020, 46(6), 727–749. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1828815>
9. Кудасов К.К., Берстенёв С.В., Волков Д.В., Жамбакин К.Ж. Лимонная кислота. Обзор. *Новости науки Казахстана. Акционерное общество Национальный центр научно-технической информации*, 2015, 3(125), 121–153. EDN: XTXDGH
10. Vandenberghe L.P., Soccol C.R., Pandey A., Lebeault J.M. Microbial production of citric acid. *Braz. Arch. Biol.*, 1999, 42, 263–276. <https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000300001>
11. Hu W., Liu J., Chen J.H., Wang S.Y., Lu D., Wu Q.H., Li W.J. A mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 2014, 15(11), 1006. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400132>
12. Wang L., Cao Z., Hou L., Yin L., Wang D., Gao Q., Wang D. The opposite roles of *agdA* and *glaA* on citric acid production in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 5791–5803. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7324-z>
13. Wang B., Li H., Zhu L., Tan F., Li Y., Zhang, L., Shi G. High-efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2017, 40(6), 891–899. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1753-7>
14. Yu B., Zhang X., Sun W., Xi X., Zhao N., Huang Z., Ying H. Continuous citric acid production in repeated-fed batch fermentation by *Aspergillus niger* immobilized on a new porous foam. *J. Biotechnol.*, 2018, 276, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.03.015>
15. Wang L., Zhang J., Cao Z., Wang Y., Gao Q., Zhang J., Wang D. Inhibition of oxidative phosphorylation for en-

- hancing citric acid production by *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Fact.*, 2015, 14(1), 7.
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0190-z>
16. Xu J., Chen Y.Q., Zhang H.J., Wang K., Tang L., Zhang J.H., Mao Z.G. Optimization of the integrated citric acid–methane fermentation process by air stripping and glucoamylase addition. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2015, 38, 411–420.
<https://doi.org/10.1007/s00449-014-1280-8>
17. Xue X., Bi F., Liu B., Li J., Zhang L., Zhang J., Wang D. Improving citric acid production of an industrial *Aspergillus niger* CGMCC 10142: identification and overexpression of a high-affinity glucose transporter with different promoters. *Microb. Cell Fact.*, 2021, 20(1), 168.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01659-3>
18. Max B., Salgado J.M., Rodríguez N., Cortés S., Converti A., Domínguez J.M. Biotechnological production of citric acid. *Braz. J. Microbiol.*, 2010, 41, 862–875.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400005>
19. Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.*, 2007, 25(3), 244–263.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>
20. Dronawati S.N., Svihla C.K., Hanley T.R. The effects of agitation and aeration on the production of gluconic acid by *Aspergillus niger*. *Applied Biochem. Biotechnol.*, 1995, 51, 347–354.
<https://doi.org/10.1007/BF02933438>
21. Soccol C.R., Vandenberghe L.P., Rodrigues C., Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, 44(2), 141–149. FTB-1643
22. Sun X., Wu H., Zhao G., Li Z., Wu X., Liu H., Zheng Z. Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by chsC gene silencing. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2018, 41, 1029–1038.
<https://doi.org/10.1007/s00449-018-1932-1>
23. Mores S., de Souza Vandenberghe L.P., Júnior A.I.M., de Carvalho J.C., de Mello A.F.M., Pandey A., Soccol C.R. Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges. *Bioresour. Technol.*, 2021, 320, 124426.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124426>
24. Meijer S., Nielsen M.L., Olsson L., Nielsen J. Gene deletion of cytosolic ATP: citrate lyase leads to altered organic acid production in *Aspergillus niger*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 36(10), 1275–1280.
<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0607-y>
25. Kirimura K., Kobayashi K., Yoshioka I. Decrease of citric acid produced by *Aspergillus niger* through disruption of the gene encoding a putative mitochondrial citrate-oxoglutarate shuttle protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2019, 83(8), 1538–1546.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1574205>
26. Steiger M.G., Rassinger A., Mattanovich D., Sauer M. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. *Metab. Eng.*, 2019, 52, 224–231.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.004>
27. Barth G., Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica*. *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Springer, 1996, 1, 313–388.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-38583-4>
28. Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., Souciet J. L. Genome evolution in yeasts. *Nature*. Nature Publishing Group UK London, 2004, 430(6995) 35–44.
<https://doi.org/10.1038/nature02579>
29. Mukhopadhyay P., Ghosh S.K., Sarkar S. Implementation of microbe-based metal nanoparticles in water remediation. *Environmental Applications of Microbial Nanotechnology*. Elsevier, 2023, 183–197.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91744-5.00008-4>
30. Qiao K., Wasylenko T.M., Zhou K., Xu P., Stephanopoulos G. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. *Nat. Biotechnol.*, Nature Publishing Group US New York, 2017, 35(2), 173–177.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3763>
31. Yuzbasheva E.Y., Mostova E.B., Andreeva N.I., Yuzbashev T.V., Fedorov A.S., Konova I.A., Sineoky S.P. A metabolic engineering strategy for producing free fatty acids by the *Yarrowia lipolytica* yeast based on impairment of glycerol metabolism. *Biotechnol. Bioeng.*, 2018, 115(2), 433–443.
<https://doi.org/10.1002/bit.26402>
32. Zhang S., Jagtap S.S., Deewan A., Rao C.V. pH selectively regulates citric acid and lipid production in *Yarrowia lipolytica* W29 during nitrogen-limited growth on glucose. *J. Biotechnol.*, 2019, 290, 10–15.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.10.012>
33. Yuzbasheva E.Y., Agrimi G., Yuzbashev T.V., Scarcia P., Vinogradova E.B., Palmieri L., Sineoky S.P. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: Its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid. *Metab. Eng.*, 2019, 54, 264–274.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.002>
34. Beopoulos A., Nicaud J.-M., Gaillardin C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 90, 1193–1206.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3212-8>
35. Yuzbasheva E.Y., Scarcia P., Yuzbashev T.V., Messina E., Kosikhina I.M., Palmieri L., Agrimi G. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the selective and high-level production of isocitric acid through manipulation of mitochondrial dicarboxylate–tricarboxylate carriers. *Metab. Eng.*, 2021, 65, 156–166.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.11.001>
36. Erian A.M., Egermeier M., Rassinger A., Marx H., Sauer M. Identification of the citrate exporter *Cex1* of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.*, 2020, 20(7), foaa055.
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa055>
37. Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenergy*, 2013, 48, 148–166.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.11.021>
38. Liu X.Y., Chi Z., Liu G.L., Madzak C., Chi Z.M. Both decrease in *ACL1* gene expression and increase in *ICL1* gene expression in marine-derived yeast *Yarrowia lipolytica* expressing *INU1* gene enhance citric acid production from inulin. *Mar. Biotechnol.*, 2013, 15, 26–36.
<https://doi.org/10.1007/s10126-012-9452-5>

39. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N. The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97(16), 7387–7397.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5054-z>
40. Rakicka M., Wolniak J., Lazar Z., Rymowicz W. Production of high titer of citric acid from inulin. *BMC Biotechnol.*, 2019, 19, 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s12896-019-0503-0>
41. Lazar Z., Neuveglise, C., Rossignol T., Devillers H., Morin N., Robak M., Crutz-Le Coq A. M. Characterization of hexose transporters in *Yarrowia lipolytica* reveals new groups of Sugar Porters involved in yeast growth. *Fungal Genet. Biol.*, 2017, 100, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.01.001>
42. Bricker D.K., Taylor E.B., Schell J.C., Orsak T., Boutron A., Chen Y.C., Rutter J. A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate Uptake in Yeast, *Drosophila*, and Humans. *Science*, 2012, 337(6090), 96–100.
<https://doi.org/10.1126/science.12180>
43. Sharma N., Okere I.C., Brunengraber D.Z., McElfresh T.A., King K.L., Sterk J.P., Stanley W. C. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and citric acid cycle intermediates during high cardiac power generation. *J. Physiol.*, 2005, 562(2), 593–603.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.075713>
44. He A., Dean J.M., Lodhi I.J. Peroxisomes as cellular adaptors to metabolic and environmental stress. *Trends Cell Biol.*, 2021, 31(8), 656–670.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.02.005>

Prospects of Development of Biotechnologies for Citric Acid Production

D. A. Dementev^{a, b, #}, Yu. A. Rybakov^{a, b}, and S. P. Sineoky^{a, b}

^aNational Bioresource Center “Russian National Collection of Industrial Microorganisms”,
Scientific Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^bNational Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute”), Moscow, 123182 Russia

[#]e-mail: dmitry@dementiev-da.ru

Abstract—The biotechnological production of citric acid (CA) is one of the largest and fastest-growing sectors in the global biotechnology market. It is produced in crystalline form and as citrate salts, widely employed in the food industry, household chemicals, cosmetics, metallurgy, and the petroleum extraction sector. Global CA production exceeds 2 million tons per year and is increasing by approximately 4% annually. Traditional biotechnological CA production relies on the utilization of mycelial fungi, specifically *Aspergillus niger*, as the producer. Various alternative CA producers, including yeast and bacteria-based systems, have been described. However, from an economic standpoint, they lag behind industrial *A. niger* producers. Among the most promising, environmentally friendly, and high-tech CA producers are strains of the yeast *Yarrowia lipolytica*. The development of competitive biotechnologies for CA production using *Y. lipolytica* yeast strains with glucose as a carbon source has become feasible due to advancements in understanding the genetic control of CA transport and metabolism within the cell.

Keywords: *Aspergillus niger*, citric acid, *Yarrowia lipolytica*