

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *Yarrowia lipolytica*. МИНИ-ОБЗОР

© 2024 г. Д. А. Дементьев^{1, 2, *, **}, Т. А. Хабибуллин^{1, 2}, С. П. Синеокий^{1, 2}

¹Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

²НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

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

**e-mail: nrcki@nrcki.ru

Поступила в редакцию 16.11.2024 г.

После доработки 22.11.2024 г.

Принята к публикации 23.11.2024 г.

Изолимонная кислота (ИЛК), является изомером лимонной кислоты (ЛК), широко используемой в пищевой промышленности, в бытовой химии и других областях. ИЛК входит в состав некоторых фруктовых соков и отличается от ЛК рядом ценных свойств, в частности, связанных с ее высокой антиокислительной активностью. ИЛК используется в спортивном питании, повышая насыщение крови кислородом, перспективна для использования в медицинских препаратах, в частности, для лечения железодефицитной анемии и предотвращения тромбозов сосудов. Ограниченность масштабов использования ИЛК, в значительной степени, определяется ее высокой себестоимостью. Известные ранее биотехнологические способы ее производства, основанные на платформе дрожжей *Yarrowia lipolytica* с использованием в качестве источника углерода глицерина или этанола и позволяли получать ИЛК в смеси с ЛК. Результаты изучения генетического контроля митохондриального транспорта ИЛК в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* и разработка эффективной методологии генетической инженерии для этих дрожжей открывают возможности для существенного снижения себестоимости и расширения масштабов биотехнологического производства этой кислоты с использованием в качестве сырья глюкозной патоки, получаемой путем глубокой переработки зерна. Это может значительно снизить себестоимость ИЛК и расширить области и масштабы ее использования.

Ключевые слова: *Yarrowia lipolytica*, изолимонная кислота (ИЛК), лимонная кислота (ЛК)

DOI: 10.56304/S0234275824060048

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнологическое производство органических кислот является одним из крупнейших и быстрорастущих секторов современной промышленной биотехнологии. Органические кислоты, прежде всего лимонная, уксусная и молочная, широко используются в пищевой промышленности и во многих других областях.

Лимонная кислота (ЛК) является наиболее крупным по масштабам промышленного производства биотехнологическим продуктом. Ее годовое производство в мире составляет более 2 млн т. Широкое использование ЛК связано как с ее промышленно-ценными и потребительскими свойствами, так и относительно низкой себестоимостью ее получения по хорошо отработанной традиционной технологии на основе использования мицелиальных грибов *Aspergillus niger* [1].

Изолимонная кислота (ИЛК, (C₆H₈O₇, 1-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновая кислота) – бесцветное кристаллическое вещество, с молярной массой 192.12 г/моль и температурой плавления ~125°C. Она плохо растворима в воде и органических растворителях. Значения констант диссоциации кислоты (рКа) составляют 3.29, 4.71 и 6.40. Как любая органическая кислота ИЛК может образовывать сложные эфиры и соли. ИЛК является одновременно α-, β- и γ-гидроксикислотой. Как α-гидроксикислота, она взаимодействует с галогенидами фосфора и образует α-кетокислоты, а при нагревании с минеральными кислотами образует димерные сложные эфиры. В качестве β-гидроксикислоты она дегидратируется до ненасыщенных

Список сокращений: AcCoA – ацетилкофермент А; FFA – жирные кислоты; TAG – триацилглицериды; ИЛК – изолимонная кислота; ЛК – лимонная кислота; ЦТК, ТСА – цикл трикарбоновых кислот.

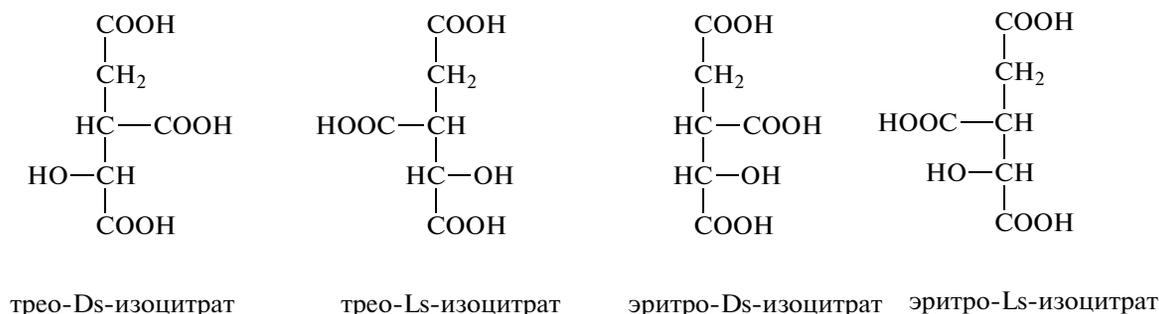


Рис. 1. Стереизомеры изолимонной кислоты (ИЛК).

Fig. 1. Stereoisomers of isocitric acid (ICA).

карбоновых кислот и может превращаться в γ -лактон (с $t_{пл}$ 156–157°C) [2].

В цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) ИЛК образуется из ЛК под действием фермента аконитатгидратазы и затем превращается в α -кетоглутарат с помощью изоцитратдегидрогеназы (ИДН). В живых организмах ИЛК существует в форме трео-Ds-изоцитрата и играет важную роль в метаболизме. В свободном состоянии она встречается в растениях, особенно в суккулентах и плодах, таких как ежевика, в которой составляет 65–85% от общего количества органических кислот [3].

ИЛК обладает высокими потребительскими свойствами, причем по антиокислительной активности, она занимает уникальное положение среди остальных промышленных органических кислот. Однако, объемы производства ограничены высокой себестоимостью ее получения и, как следствие, существующими рынками сбыта, представленными в основном индустрией спортивного питания, где она может использоваться в качестве биологически активной добавки, способствующей повышению насыщения крови кислородом при физических нагрузках [3–5].

ИЛК является единственным метаболитом цикла Кребса, который может активировать сукцинатдегидрогеназу, тем самым поддерживая клеточное дыхание даже при продолжительных и интенсивных стрессовых воздействиях.

Гепатопротекторные и антигипоксические свойства ИЛК делают ее перспективной для широкого использования не только в спортивном питании, но и в медицине [3, 5].

Более широкому применению и поиску новых сфер применения ИЛК мешает несколько факторов. Относительно дешевое производство ИЛК возможно путем химического синтеза, в результате чего образуется смесь стереоизомеров, крайне трудно поддающихся разделению [5] (см. рис. 1). В то же время, в природе встречается только изомер трео-Ds-изоцитрат, именно он обладает антиоксидант-

ными свойствами и делает ИЛК перспективным для фармацевтического производства. В отличие от него, остальные изомеры действуют как ингибиторы клеточных ферментов [3, 5]. Это обстоятельство делает химический синтез ИЛК малоперспективным для широкого промышленного использования.

Изомер трео-Ds-изоцитрат, выделяют, в основном, из растительных источников. Однако, возникают сложности, связанные с дорогостоящим технологическим процессом очистки продукта, так как соки и плоды содержат широкий спектр других органических веществ. Эти факторы обуславливают высокую себестоимость способа получения ИЛК из растительных субстратов. Для получения химически чистого трео-Ds-изоцитрата, используемого в качестве химического реактива, компания Sigma (США) использует метод выделения из сока специально выращиваемого растения *Sedum spectabile*. Тем не менее, на 2024 г. стоимость монокалийевой соли трео-Ds-изоцитрат (каталожный номер 58790) превышает 1000 евро за 1 г.

Как итог, все эти факторы подталкивают к необходимости создания новой технологии по производству изомера трео-Ds-изоцитрата, чему дополнительно способствует глубокая переработка зерна, которая в настоящее время в мире и в России, в частности, усиленно развивается. Растительный белок в больших объемах востребован на российском и зарубежном рынке, а при переработке 1 млн т зерна можно получить более 100 000 т ценного растительного белка и более 600 000 т глюкозы. Увеличение масштабов глубокой переработки зерна пшеницы и кукурузы в РФ, в настоящее время, связаны, в основном, с ограниченностью рынка использования глюкозы (глюкозной патоки). Реальным путем увеличения этого рынка является развитие крупнотоннажных биотехнологий для получения продуктов, основанных на ее использовании. Одними из наиболее емких и перспективных секторов крупнотоннажной биотехнологической продукции являются органические кислоты, в том

числе ЛК и ИЛК. Перспективы биотехнологического получения этих кислот, в основном, связываются с разработкой эффективных штаммов продуцентов на основе дрожжей *Yarrowia lipolytica* [3, 5].

Дрожжи *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica это аскомицетные дрожжи, которые не способны к брожению — для их метаболизма не характерны ни эффект Пастера, ни эффект Кребтри [6]. Морфология этих дрожжей варьируется в зависимости от условий роста: они могут принимать форму одиночных клеток, гифов или псевдогифов. *Y. lipolytica* являются гетероталличными дрожжами и имеют два типа спаривания — MatA и MatB, причем большинство природных изолятов гаплоидны [7]. В отличие от большинства гемиаскомицетных дрожжей, *Y. lipolytica* является облигатным аэробом и для их роста необходим кислород.

Дрожжи *Y. lipolytica* — естественные продуценты ЛК и ИЛК, способны метаболизировать помимо глюкозы широкий спектр органических субстратов, в т. ч. *n*-парафины, глицерин и растительные масла. Геном *Y. lipolytica* имеет значительное сходство с геномом *Saccharomyces cerevisiae*, что расширяет возможности для генетических исследований и модификаций с применением уже существующих подходов, разработанных для *S. cerevisiae*. Естественная среда обитания *Y. lipolytica* включает выбросы нефти и пищевые продукты, такие как сыр, кефир, йогурт, мясо и соя [1, 8].

Дрожжи *Y. lipolytica* относятся к биобезопасным микроорганизмам, имеющих статус GRAS (Generally Recognized as Safe) по классификации Управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), как, собственно, и ИЛК, а также другие продукты, основанные на ее синтезе, и могут использоваться в пищевой промышленности, медицине [9–12]. Разработанная для этих дрожжей методология генетической и метаболической инженерии позволяет рассматривать *Y. lipolytica* как удобную платформу для создания продуцентов различных промышленно-ценных веществ, в т. ч. предназначенных для использования в медицинской и пищевой промышленности [1, 8].

Начиная с 1960-х годов дрожжи *Y. lipolytica* активно изучались и рассматривались как перспективный продуцент ЛК при использовании в качестве источника углерода глицерина, растительных масел или этанола. В разработанных технологиях получения ЛК на основе штаммов *Yarrowia lipolytica* в значимых количествах в качестве примеси накапливается ИЛК, что существенно затрудняет кристаллизацию ЛК в ходе ее выделения и очистки.

Уже в 1970 годах стали появляться работы, направленные на создание на основе *Y. lipolytica* продуцентов ИЛК. С этой целью в основном исполь-

зовались селекционные подходы, оптимизация состава питательных сред и условий культивирования. С начала 2000 годов для получения продуцентов ИЛК все более широко стали использоваться методы генетической инженерии. Как селекционные, так и генно-инженерные работы были основаны на результатах изучения метаболизма ЛК и ИЛК. Итоги этих работ подробно описаны, в т. ч. в обзоре Камзоловой и др. [5].

Рассмотренные в обзоре работы были посвящены изучению метаболизма цитрата и изоцитрата при использовании различных источников углерода. И, хоть, основные метаболические превращения в ЦТК, ведущие к образованию цитрата и изоцитрата остаются постоянными, природа и локализация катаболических процессов, протекающих при усвоении субстрата, могут варьироваться в зависимости от используемого клеткой источника углерода. Безусловно, при разработке продуцентов изоцитрата данная вариативность должна быть учтена.

На рис. 2 представлены основные катаболические процессы, протекающие в клетках *Y. lipolytica*, при потреблении ей субстратов разного происхождения, и их локализация.

Так, при диссимиляции масел (триацилглицеридов, TAG), TAG сначала расщепляются до глицерина и свободных жирных кислот (FFA), которые транспортируются в клетку и включаются в метаболизм. При этом образуются сразу два важных для синтеза цитрата и изоцитрата интермедиата: пируват из глицерина и ацетилкофермент А (AcCoA) из свободных FFA при бета-окислении.

При усвоении этанола в качестве единственного источника углерода в цитозоле могут также образовываться сразу как пируват, так и AcCoA.

Метаболизм цитрата и изоцитрата из глюкозы как источника углерода включает несколько ключевых этапов (см. рис. 3).

Этап первый: глюкоза сначала превращается в пируват (Pyr) в процессе гликолиза, который происходит в цитозоле. Пируват затем транспортируется в митохондрии.

Этап второй: В митохондриях пируват превращается в AcCoA и оксалацетат (OAA), которые входят в ЦТК. Цитрат (Cit), образуется из AcCoA и оксалацетата.

Этап третий: Фермент аконитаза (аконитатгидратаза) катализирует стереоспецифическую реакцию превращения цитрата в изоцитрат (Iso) через образование промежуточного соединения — цис-аконитата.

Этап четвертый: цитрат и изоцитрат транспортируются из митохондрии в цитозоль, где цитрат может служить источником цитозольного AcCoA, превращаясь в оксалацетат и AcCoA

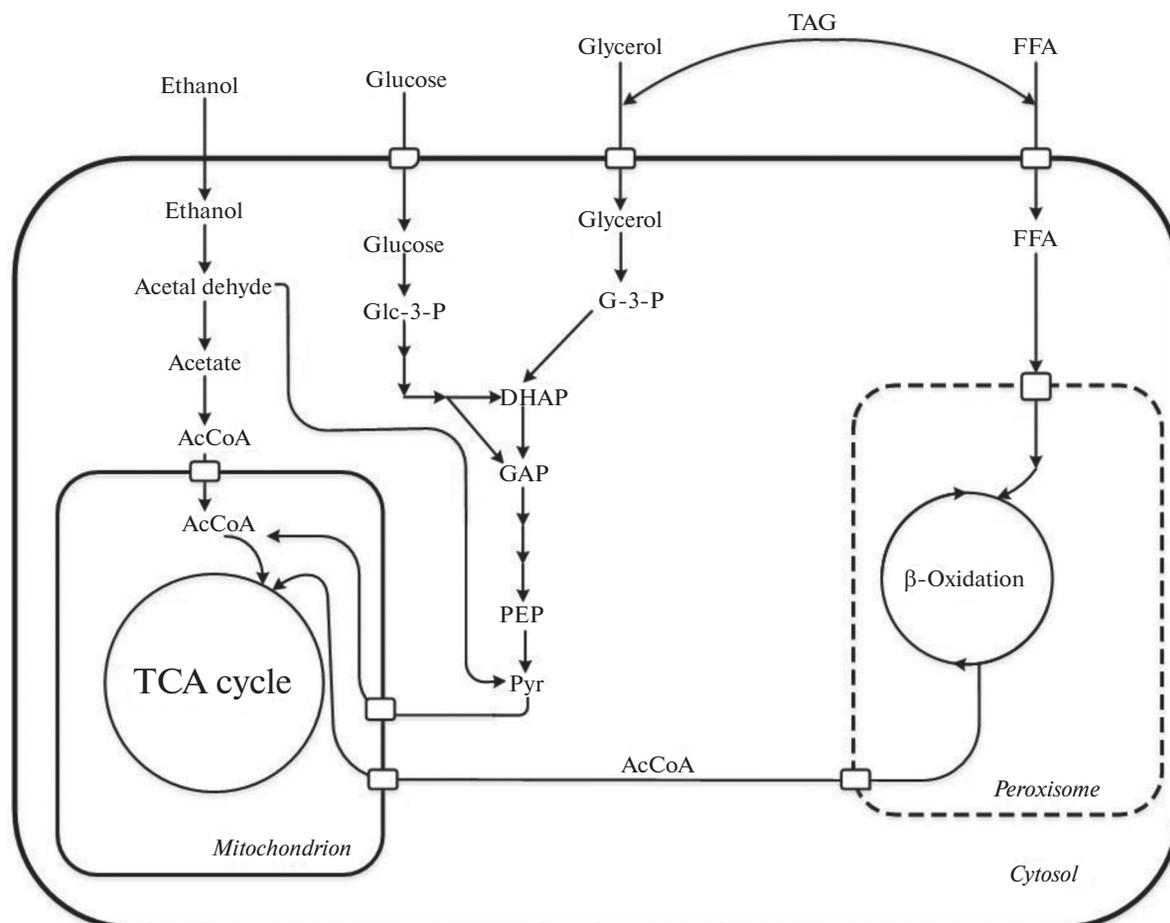


Рис. 2. Катаболизм этанола, глюкозы и масел (триацилглицеридов, TAG) в дрожжах *Y. lipolytica*. DHAP – дигидроксиацетонфосфат, FFA – свободные жирные кислоты, G-3-P – глицерин-3-фосфат, GAP – глицеральдегид-3-фосфат, PEP – фосфоенолпируват, Pyr – пируват, TAG – триацилглицериды.

Fig. 2 Catabolism of ethanol, glucose and oils (triacylglycerides, TAG) in the yeast *Y. lipolytica*. DHAP – dihydroxyacetone phosphate, FFA – free fatty acids, G-3-P – glycerol-3-phosphate, GAP – glyceraldehyde-3-phosphate, PEP – phosphoenolpyruvate, Pyr – pyruvate, TAG – triacylglycerides.

Как уже упоминалось выше, этапы синтеза цитрата и изоцитрата из поступающего в митохондрии пирувата и транспорт этих солей из митохондрии общие при использовании всех рассматриваемых субстратов.

Для накопления цитрата и изоцитрата в митохондриях важную роль играет ингибирование реакции ЦТК, в результате которой под действием фермента изоцитратдегидрогеназы изоцитрат превращается в α -кетоглутарат. Ингибирование активности данного фермента может достигаться лимитированием поступления внеклеточного азота. В этих условиях, требующийся клетке аммоний частично образуется из аденозинмонофосфата (АМР), благодаря активности аденозинмонофосфатдезаминазы (АМРД) [18, 16]. Действие АМРД на АМР, который является аллостерическим активатором изоцитратдегидрогеназы, приводит к

снижению ее активности и частичному прерыванию ЦТК, что и способствует накоплению цитрата и изоцитрата в митохондриях. Использование генно-инженерных подходов до 2020 г. сводилось, в основном, к интеграции дополнительной копии гена *ACO1* в целях повышения активности аконитатгидратазы, контролирующей изомеризацию цитрата в изоцитрат [19], однако эта генетические модификации не оказывала существенного эффекта на синтез изоцитрата. Определенное ожидаемое положительное влияние на накопление как цитрата, так и изоцитрата оказало увеличение экспрессии АМРД, что, очевидно, связано с увеличением эффекта голодания по азоту [16, 20].

Наиболее значимые результаты до 2020 г. были достигнуты при использовании селективно полученных штаммов *Y. lipolytica* и оптимизации питательных сред и условий культивирования при

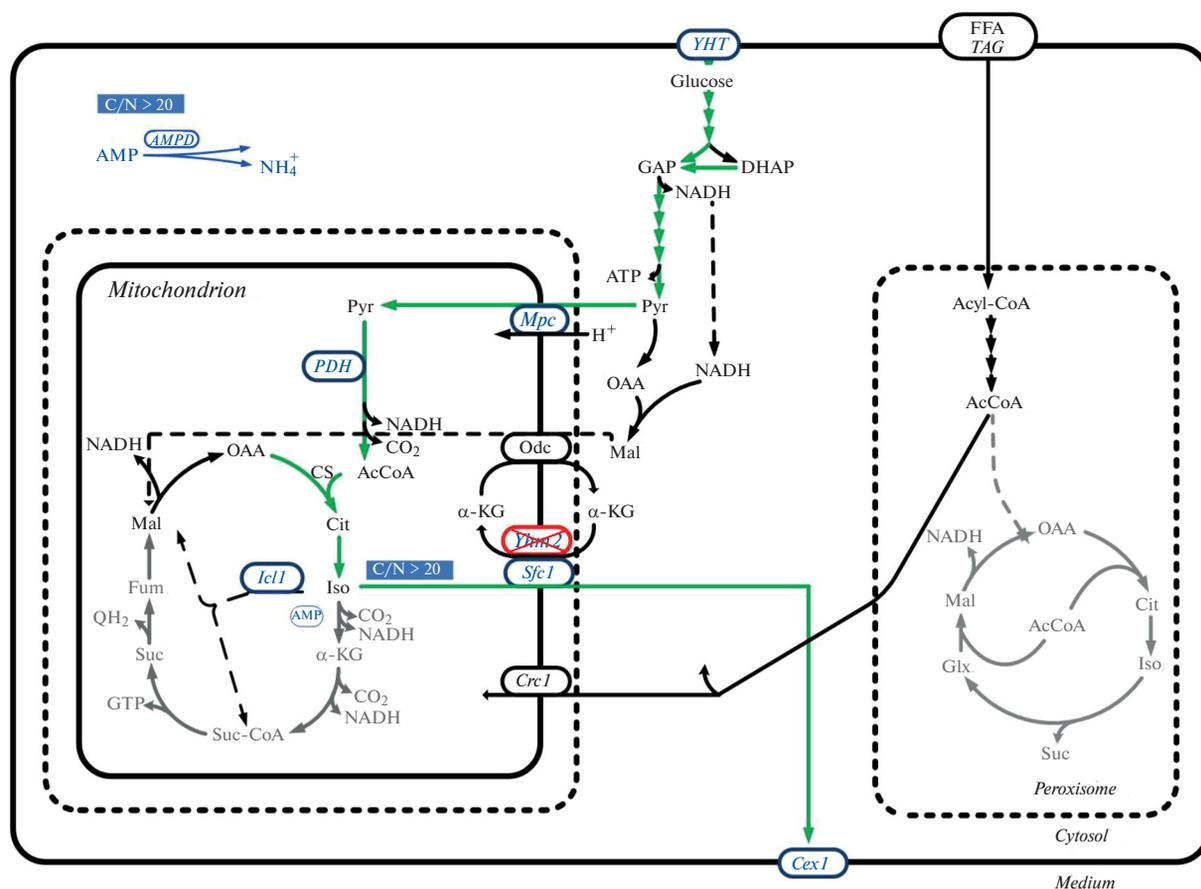


Рис. 3. Механизм синтеза изоцитрата *Y. lipolytica* при азотном голодании с глюкозой в качестве источника углерода (Дополненная схема из статей [1, 16]). Зелеными стрелками обозначен прямой путь синтеза ИЛК. GAP – глицеральдегид-3-фосфат; DHAP – дигидроксиацетонфосфат; Pyr – пируват; AcCoA – ацетилкофермент А; OAA – оксалоацетат; Cit – цитрат; *Crc1* – переносчик ацетил-CoA в митохондрию из цитозоли; CS – цитратсинтаза; Iso – изоцитрат; *Icl1* – изоцитратлиаза; α -KG – α -кетоглутарат; Suc-CoA – сукцинил-CoA; Suc – сукцинат; Fum – фумарат; Mal – малат; Acyl-CoA – ацил-CoA; *PDH* – комплекс пируватдегидрогеназы; *Mpc* – митохондриальный переносчик пирувата; *Yhm2* – митохондриальный переносчик цитрата-оксоглутарата; *Cex1* – переносчик цитрата из клетки.

Fig. 3. The mechanism of isocitrate synthesis in *Y. lipolytica* under nitrogen starvation with glucose as a carbon source (Supplemented scheme from the articles [1, 16]). Green arrows indicate the direct pathway for ICA synthesis. GAP – glyceraldehyde 3-phosphate; DHAP – dihydroxyacetone phosphate; Pyr – pyruvate; Acet-CoA – acetyl-CoA; OAA – oxaloacetate; Cit – citrate; *Crc1* – Acetyl-CoA transporter to mitochondria from the cytosol; CS – citrate synthase; Iso – isocitrate; *Icl1* – Isocitrate lyase; α -KG – α -ketoglutarate; Suc-CoA – succinyl-CoA; Suc – succinate; Fum – fumarate; Mal – malate; Acyl-CoA – acyl-CoA; *PDH* – pyruvate dehydrogenase complex; *Mpc* – mitochondrial pyruvate carrier; *Yhm2* – mitochondrial citrate-oxoglutarate carrier; *Cex1* – citrate carrier from the cell.

дополнительном ингибировании итаконовой кислотой активности изоцитратлиазы с лимитированием по азоту [4, 19].

В табл. 1 в качестве примеров представлены результаты синтеза ИЛК в ферментере штаммом ВКМ У-2373 с использованием различных субстратов, а также штаммом-продуцентом ВКПМ У-4657 использующем глюкозу.

Так, в ферментере при периодической ферментации с использованием в качестве субстрата этанола было получено около 90 г/л ИЛК при содержании в КЖ 20% ЛК, а уровень накопления

ИЛК 80–90 г/л при 20–50% ЛК был достигнут когда субстратами служили растительные масла [4, 21, 22]

Во всех работах этого периода значимые результаты по уровню синтеза ИЛК достигались если субстратами служили растительные масла, этанол и глицерин [5].

Основная причина существенно более низкого уровня синтеза ЛК и ИЛК при использовании глюкозы, чем в случае применения масла и этанола, связана с тем, что оба последних субстрата являются источниками как пирувата поступающего в ЦТК, так и непосредственно цитозольного Ас-

Таблица 1. Синтез ИЛК штаммами продуцентами *Y. lipolytica***Table 1.** Synthesis of ICA by *Y. lipolytica*-producing strains

Штамм	Субстрат	Уровни накопления ИЛК, г/л	Соотношение ИЛК к ЛК	Скорость синтеза ИЛК, г/л/ч	Ссылка
VKM Y-2373	Рапсовое масло	64.1	2.9	0.54	[11]
VKM Y-2373	Глицеринсодержащие отходы биодизельной промышленности	40.4	0.6	—	[13]
VKM Y-2373	Подсолнечное масло	70	1.4	1.14	[14]
VKM Y-2373	Этанол	109.6	2.5	1.35	[15]
ВКПМ Y-4657	Глюкоза	136.7	7.4	1.32	[16, 17]

CoA (см. рис. 2), требующегося клетке, прежде всего, для синтеза клеточных липидов.

При использовании масла и этанола на получение цитозольного AcCoA потребность расходования транспортируемого из митохондрии в цитозоль цитрата сокращается и он в значительно большем количестве может секретироваться из клетки.

Если субстратом служит глюкоза, единственным источником AcCoA является транспортируемый из митохондрии в цитозоль цитрат и его доля секретлируемая из клетки сокращается.

Качественно новые возможности разработки эффективных продуцентов как ЛК, так и ИЛК на основе *Y. lipolytica* с использованием в качестве субстрата глюкозы появились после обнаружения митохондриального транспортера цитрата, кодируемого геном *YUhm2* [20], а также идентификация митохондриального сукцинат-фумаратного транспортера *YISfc1* [16], контролирующего транспорт изоцитрата из митохондрии в цитозоль. Комбинирование направленного усиления и снижения экспрессии этих транспортеров позволило избирательно и селективно как увеличивать, так и уменьшать транспорт цитрата и изоцитрата из клетки.

Примечательно, что для штамма W29 *YIAMPD ΔYUhm2* уменьшение синтеза ЛК наиболее существенно в случае применения в качестве субстрата глюкозы (практически полный блок), и в меньшей степени масла (сокращение, примерно, в 2 раза). Влияние делеции гена транспортера *YUhm2* на синтез ИЛК по-другому зависит от субстратов: при использовании глюкозы синтез ИЛК сокращается, примерно на 60%, а при ферментации на масле немного увеличивается и W29 *YIAMPD ΔYUhm2* дает около 100 г/л ИЛК [16].

То, что делеция гена *YUhm2* при использовании масла блокирует синтез ЛК, но не ИЛК позволило сделать заключение о специфичности этого транспортера для ЛК. Почему делеция гена *YUhm2* при ферментации на глюкозе приводит к сокращению синтеза не только ЛК, но и ИЛК остается неясным. Примечательно также, что делеция гена

YUhm2 не приводит к ограничению роста дрожжей на субстратах с глюкозой, что можно было бы ожидать при полном блоке транспорта цитрата из митохондрии в периплазму и, как следствие, лимита цитозольного AcCoA. Данный факт позволил предположить, что при делеции гена *YUhm2* существуют другие минорные источники цитозольного AcCoA [16].

То, что транспортер изоцитрата *YISfc1*, существенно не влияет на транспорт цитрата подтверждается тем, что делеция гена *YISfc1* приводит к практически полному блоку синтеза изоцитрата значимо не влияет на синтез цитрата [16].

Наибольший эффект в увеличении синтеза ИЛК при использовании глюкозы и оливкового масла удалось достичь при делеции гена *YUhm2* и усилении экспрессии гена *YISfc1*. Так, при ферментации штамма W29 *ΔYUhm2 ΔYISfc1* на глюкозе удалось достичь накопления около 140 г/л с соотношением ИЛК /ЛК около 9 : 1 [16, 17].

Уровень синтеза ИЛК и соотношение ИЛК/ЛК в этом случае оказалось существенно выше, чем для ранее описанных продуцентов ИЛК полученных в результате селекции или усиления экспрессии генов в ранее описанных выращиваемых при использовании в качестве субстратов растительных масел, глицерина или этанола [4, 21, 22].

Эффективный синтез ИЛК и низкий уровень ЛК на глюкозе при выключенном митохондриальном транспортере *YUhm2* и усилении митохондриального транспортера изоцитрата (*YISfc1*), связан с тем, что цитрат, синтезируемый в митохондрии в отсутствие эффективного транспорта, преимущественно переходит в изоцитрат, транспортируемый из митохондрии в условия ингибирования изоцитратдегидрогеназы. При этом вероятно потребности клетки в цитозольном AcCoA могут обеспечиваться остаточным транспортом цитрата из митохондрии менее эффективными альтернативными путями.

*Возможности разработки эффективных
промышленных технологий получения ИЛК
на основе генно-инженерных продуцентов
Yarrowia lipolytica*

Достигнутые показатели по накоплению ИЛК и конверсии глюкозы в ИЛК при ферментации штамма *Y. lipolytica* W29 *Y1AMPD ΔY1Yhm2 Y1Sfc1* на глюкозе открывают возможности разработки эффективной технологии промышленного получения ИЛК на основе генно-модифицированных дрожжей *Y. lipolytica* и снижения ее себестоимости при использовании сред на основе глюкозной патоки.

При разработке такой технологии штамм W29 *Y1AMPD ΔY1Yhm2 Y1Sfc1* может служить основой для направленного введения дополнительных генетических модификаций в целях оптимизации метаболизма изоцитрата, его транспорта из клетки, изменения морфологии клеток в целях снижения вязкости культуральной жидкости, что особенно важно при высокой концентрации клеток в ходе ферментации.

Перспективы улучшения продуктивности ИЛК путем усиления ее транспорта из клетки, связаны, в частности, с обнаружением общего транспортера ЛК и ИЛК (ген *Y1Cex*) из клетки и демонстрацией влияния его сверхэкспрессии на усиление синтеза как ЛК, так и ИЛК [23].

В ходе разработки промышленной технологии также могут использоваться результаты проведенных ранее многочисленных работ по изучению влияния различных компонентов питательной среды и условий ферментации на синтез как ЛК, так и ИЛК. К примеру, уровень ионов Fe^{2+} может снизить влияние низкого рН, предотвращая нежелательный морфологический переход дрожжей [24].

При разработке технологии получения ИЛК на основе *Y. lipolytica* может быть поставлена задача снижения рН ферментационной среды в целях повышения доли свободной ИЛК, что может быть важно для прямого ее выделения на ионообменных колоннах и снижения себестоимости этапа выделения.

Разработка технологий эффективного биотехнологического получения ИЛК с себестоимостью ее получения сопоставимой с себестоимостью ЛК ставит задачу изучения возможностей расширения использования ИЛК как в традиционных сферах применения ЛК, в т. ч. в пищевой промышленности, так и в других областях с учетом ее уникальных промышленно-ценных свойств ИЛК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени опубликовано значительное количество работ, посвященных биотехнологическому производству различных органических кислот, включая ИЛК. Существуют разра-

ботки и патенты, касающиеся биосинтеза ИЛК с использованием дрожжей *Y. lipolytica* в качестве продуцента. Однако все эти разработки основаны на применении относительно дорогостоящих субстратов, таких как этанол, глицерин, рапсовое масло, инулин и другие.

При глубокой переработке зерна (кукурузы или пшеницы) наиболее ценным получаемым продуктом является белок. Глюкозная патока является менее ценным сопутствующим продуктом и ее себестоимость примерно равна стоимости зерна, т.е. около 10–15 р/кг. Эффективная утилизация крупных объемов глюкозной патоки возможна только при развитии крупнотоннажной промышленной биотехнологии при тесной связи перерабатывающих и крупных биотехнологических компаний и наличии конкурентоспособных биотехнологий для производства тоннажной продукции, к которым относится получение ЛК и ИЛК. При этом биотехнологические компании могут использовать патоку, фактически, по ее себестоимости.

Результаты последних лет по изучению митохондриального транспорта цитрата и изоцитрата позволяют качественно улучшить технологические показатели рекомбинантных продуцентов ИЛК дрожжей *Y. lipolytica*, включая уровни накопления ИЛК и значительное снижение уровня примеси ЛК. Это открывает возможности значительного снижения себестоимости биотехнологического получения ИЛК и расширения областей и масштабов ее использования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дементьев Д.А., Рыбаков Ю.А., Синеокий С.П. Перспективы развития биотехнологий получения лимонной кислоты. *Биотехнология*, 2023, 39(5), 24–32. <https://doi.org/10.56304/S023427582305006X>
2. Изолимонная кислота. *Большая российская энциклопедия. научно-образовательный портал*. 2022. <https://bigenc.ru/c/izolimonnaia-kislota-b9e0dc/?v=3912341>.
3. Kamzolova S.V., Lunina Y.N., Allayarov R.K., Puntus I.F., Laptsev I.A., Samoilenko V.A., Morgunov I.G. Biosynthesis of isocitric acid by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its regulation. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2015, 51, 249–254. <https://doi.org/10.1134/S0003683815020076>

4. Kamzolova S.V., Shamin R.V., Stepanova N.N., Morgunov G.I., Lunina J.N., Allayarov R.K., Morgunov I.G. Fermentation conditions and media optimization for isocitric acid production from ethanol by *Yarrowia lipolytica*. *BioMed Res. Int.*, 2018, 2018(1), 2543210. <https://doi.org/10.1155/2018/2543210>
5. Kamzolova S.V., Morgunov I.G. Microbial production of (2 R, 3 S)-isocitric acid: state of the arts and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103(23), 9321–9333. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10207-4>
6. Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications *FEMS Yeast Res*, 2005, 5(6–7), 527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
7. Barth G., Gaillardin C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, 19(4), 219–237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>
8. Barth G., Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica*. Nonconventional yeasts in biotechnology. A Handbook, Springer, 1996. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_10
9. Zinjarde S.S. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem.*, 2014, 152, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.117>
10. 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>
11. Kamzolova S.V., Samoilenko V.A., Lunina J.N., Morgunov I.G. Large-Scale Production of Isocitric Acid Using *Yarrowia lipolytica* Yeast with Further Down-Stream Purification. *BioTech.*, 2023, 12(1), 22. <https://doi.org/10.3390/biotech12010022>
12. 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>
13. Morgunov I.G., Kamzolova S.V. Physiologo-biochemical characteristics of citrate-producing yeast *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol-containing waste of biodiesel industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99, 6443–6450. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6558-5>
14. Kamzolova S.V., Finogenova T.V., Morgunov I.G. Microbiological production of citric and isocitric acids from sunflower oil. *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, 46(1), 51–59.
15. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Karpukhina O.V., Bokieva S.B., Inozemtsev A.N. Biosynthesis of isocitric acid in repeated-batch culture and testing of its stress-protective activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103, 3549–3558. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09729-8>
16. 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>
17. Юзбашева Е.Ю., Юзбашев Т.В., Лантеев И.А., Косихина Ю.М., Виноградова Е.В., Таратынова М.О., Шутков А.В., Дементьев Д.А., Синеокий С.П. Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica*, продуцирующий изолимонную кислоту: пат. Патент RU2757603, бюлл. № 29, опубл. 19.10.2021.
18. 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>
19. Laptev I.A., Filimonova N.A., Allayarov R.K., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A., Sineoky S.P., Morgunov I.G. New recombinant strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* with overexpression of the aconitate hydratase gene for the obtainment of isocitric acid from rapeseed oil. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2016, 52, 699–704. <https://doi.org/10.1134/S000368381607005X>
20. 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>
21. Heretsch P., Thomas F., Aurich A., Krautscheid H., Sicker D., Giannis A. Syntheses with a chiral building block from the citric acid cycle: (2R, 3S)-isocitric acid by fermentation of sunflower oil. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47(10), 1958–1960. <https://doi.org/10.1002/anie.200705000>
22. Kamzolova S.V., Allayarov R.K., Lunina J.N., Morgunov I.G. The effect of oxalic and itaconic acids on threo-Ds-isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.*, 2016, 206, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.092>
23. 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>
24. Cogo A.J.D., Façanha A.R., da Silva Teixeira L.R., de Souza S.B., da Rocha J.G., Figueira F.F., Okorokova-Façanha A.L. Plasma membrane H⁺ pump at a crossroads of acidic and iron stresses in yeast-to-hypha transition. *Metallomics*, 2020, 12(12), 2174–2185. <https://doi.org/10.1039/d0mt00179a>

Prospects for the Development of Biotechnologies for Isocitric Acid Production Based on Genetically Engineered Strains of *Yarrowia lipolytica*: A Mini-Review

D.A. Dementev^{a, b, #, ##}, T. A. Khabibullin^{a, b}, and S. P. Sineoky^{a, b}

^aBioresource Center All-Russian Collection of Industrial Microorganisms
of the National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

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

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

^{##}e-mail: nrcki@nrcki.ru

Abstract—Isocitric acid (ICA) is an isomer of citric acid (CA), which is widely used in the food industry, household chemicals, and other fields. ICA is a constituent in some fruit juices and differs from CA due to a number of valuable properties, particularly those related to its high antioxidant activity. ICA is used in sports nutrition to enhance blood oxygenation, and is promising for use in medical preparations, particularly for the treatment of iron deficiency anemia and preventing vascular thrombosis. The limited scale of ICA use is largely determined by its high production cost. Previously known biotechnological methods of its production, based on *Yarrowia lipolytica* yeast platforms using glycerol or ethanol as carbon sources, allowed to obtain ICA mixed with CA. Recent results on the study of genetic control over mitochondrial transport of ICA in *Y. lipolytica* cells and the development of efficient genetic engineering methodologies for this yeast open up opportunities for a significant reduction in the cost and expansion of the scale of biotechnological production of this acid using as a raw material glucose molasses obtained by deep processing of grain. This could significantly reduce the cost of ICA and expand the scope and scale of its use.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, isocitric acid (ICA), citric acid (CA)