

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Садыковой Айгуль Жомартовны

«Генетические основы селекции ферментационных дрожжей *Saccharomyces* и *Kluuveromyces*» по специальности 03.02.07 – «Генетика»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Диссертационная работа Садыковой Айгуль Жомартовны посвящена систематическому исследованию штаммов *Saccharomyces* и *Kluuveromyces* из разных источников. Работа была выполнена в лаборатории ведущего специалиста России по систематике дрожжей, доктора биологических наук, профессора Наумова Г.И.

Диссертация состоит из трёх исследовательских подтем: «Молекулярно-генетические особенности и селекция спиртовых штаммов *Saccharomyces cerevisiae*»; «Молекулярный полиморфизм β -фруктозидазных генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*»; «Молочные дрожжи-пробиотики рода *Kluuveromyces*».

Актуальность тематики работы касается, в первую очередь, объектов исследования. Это штаммы *Saccharomyces*, которые используются или предполагаются к использованию в производстве спирта. Это штаммы молочных дрожжей *Kluuveromyces*, которые могут быть перспективными в качестве пробиотиков. При характеристике спиртовых штаммов *Saccharomyces* анализируются такие генетические признаки, как утилизация углеводов: сахарозы, мелибиозы и мальтозы. Если первые два признака необходимы для получения спирта с использованием дрожжей из мелассы, отхода сахарного производства, то последний признак необходим для получения спирта из крахмалосодержащего сырья. Автор уделяет внимание так же признаку термоустойчивости у дрожжей *Saccharomyces*, который актуален с точки зрения оптимизации спиртового производства, т.е. для объединения процессов сахарификации, проводимой при непермиссивных для дрожжей температурах, и последующей микробиологической ферментации сахаристого раствора с помощью дрожжей-сахаромицетов. Что касается штаммов *Kluuveromyces*, то при их характеристике анализируется признак утилизации лактозы, актуальный для пробиотиков.

Диссертация Садыковой А.Ж. изложена на 150 страницах, содержит 26 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы состоит из 294 наименований. Из них более 80 работ было опубликовано Наумовым Г.И. и его сотрудниками. Таким образом, рассматриваемая работа развивает научные концепции, в том числе, и разработанные в лаборатории.

Диссертация состоит из семи глав со сквозной нумерацией. Первые три главы: «Спиртовые дрожжи *Saccharomyces*»; «Полимерные гены ферментации сахаров»; «Молочные дрожжи рода *Kluyveromyces*» относятся к обзору литературных данных. В них обоснованы тематика и методология исследований.

В первой, наиболее обширной главе литературного обзора, рассмотрены: история таксономических исследований дрожжей *Saccharomyces*, их современная классификация, образование гибридных штаммов и направления селекции спиртовых дрожжей. В этой главе проиллюстрировано развитие таксономии, базирующееся на развитии методов исследования. Эта часть первой главы литературного обзора перекликается с третьей главой, где детально рассматривается история таксономии молочных дрожжей *Kluyveromyces*.

Из литературных данных следует, что таксономические тесты, основанные на морфолого-физиологических особенностях, могут привести к ошибочным выводам. Поэтому, проведённая автором ре-идентификация спиртовых и молочных дрожжей из разных источников с использованием современных молекулярных и генетических методов оправдана.

Современная таксономия дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* основана на гомологии рДНК и её филогенетическом анализе. Методика полимеразной цепной реакции (ПЦР) и развитый на её основе метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), с помощью которых исследуются переменные участки локуса рДНК у дрожжей (5.8S-ITS и т.д.), позволили существенно упростить идентификацию штаммов. Это, в частности, продемонстрировано в данной работе, как при идентификации штаммов *Saccharomyces*, так и в исследовании штаммов *Kluyveromyces*. Помимо ПДРФ-анализа авт. использует молекулярное кариотипирование, т.е. анализ хромосом дрожжей с помощью пульс-электрофореза в агарозном геле. Этот метод особенно оправдан для анализа культурных штаммов дрожжей, которые, как было показано ранее в лаборатории, обладают значительным полиморфизмом молекулярных кариотипов, в отличие от природных штаммов.

В заключительных разделах первой главы литературного обзора авт. рассматривает известные примеры образования межвидовых гибридов у *Saccharomyces*, как в природных, так в промышленных популяциях, а так же обосновывает использование этого метода в диссертации. Исходя из данных литературного обзора, межвидовая гибридизация для селекции спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*, сочетающих термоустойчивость с высокой ферментационной активностью, была использована впервые в данной работе.

Во второй главе литературного обзора уделяется внимание генетическим детерминантам, определяющим такие физиологические характеристики, как утилизация сахарозы, мальтозы и мелибиозы у дрожжей *Saccharomyces*. Помимо выше отмеченного практического использования, эти признаки представляют так же научный интерес с точки зрения адаптивной эволюции. Эти признаки, с одной стороны, непостоянны у дрожжей из природных источников. С другой стороны, они могут усиливать своё проявление в культурных штаммах за счёт появления дополнительных копий их генетических детерминант на разных хромосомах.

В третьей главе литературного обзора, посвящённой молочным дрожжам рода *Kluveromyces*, рассматривается роль пробиотических микроорганизмов, таксономия этого рода, а так же характеристика видов *Kluveromyces lactis* и *Kluveromyces marxianus*. Поскольку желательной функцией пробиотических микроорганизмов, помимо вытеснения патогенной микрофлоры, может быть утилизация лактозы, которая усваивается не у всех людей, делается акцент на генетические детерминанты, обуславливающие утилизацию лактозы и на виды, представители которых могут утилизировать этот дисахарид.

Экспериментальная часть начинается с четвертой главы и состоит из четырёх глав. В четвертой главе представлены материалы и методы исследования. Исследованные дрожжи *Saccharomyces* и *Kluveromyces* представлены в таблицах 1 и 2 соответственно, каждая из которых включает более 50 штаммов. Эта глава содержит описание всех методов, использованных в работе.

Полученные диссертантом результаты изложены в трёх последних главах диссертационной работы.

Так, пятая глава включает характеристику спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*, проведённую с помощью ПДРФ-анализа, молекулярного кариотипирования, а так же всестороннее изучение утилизации признаков сахарозы, мальтозы и мелибиозы. Соответствующие генетические детерминанты были исследованы на хромосомный полиморфизм с помощью гибридизации по Саузерну. Штаммы были так же исследованы на сбраживание этих углеводов. С целью получения межштаммовых гибридов со спиртовыми штаммами автор осуществил поиск наиболее термоустойчивых штаммов из коллекции лаборатории. После гибридизации были отобраны штаммы, сочетающие термоустойчивость и высокую ферментационную активность.

Как следует из литературного обзора хромосомный полиморфизм генов утилизации сахарозы, мальтозы и мелибиозы входит в круг научных интересов лаборатории. Однако, автору работы удалось внести в это направление свой вклад. В отдельную главу (глава 6) диссертации выделены исследования β -фруктозидазных генов

(гены *SUC*), т.е. кодирующих фермент, который расщепляет сахарозу, у большой выборки штаммов *Saccharomyces* различной видовой принадлежности. Было установлено, что штаммы из природных популяций содержат по одному гену *SUC2*, локализуемому практически во всех штаммов на хромосоме IX. В то время как у спиртовых штаммов присутствуют дополнительные гены *SUC1*, *SUC3*, *SUC7* и *SUC9*.

В последней седьмой главе автор проводит кропотливую работу по реидентификации нескольких десятков штаммов молочных дрожжей *Kluyveromyces*. С помощью ПДРФ-анализа и последующего тестирования характерных физиологических признаков большинство штаммов были обозначены как *Kl. marxianus*, а остальные штаммы *Kl. lactis* разделены на две разновидности *Kl. lactis* var. *lactis* и *Kl. lactis* var. *drosophilaram*. Для дальнейшего исследования признака утилизации лактозы были выбраны 29 штаммов *Kl. marxianus* из молочных продуктов. С помощью пульс-электрофореза нативных хромосомных ДНК и последующей гибридизации по Саузерну исследовались молекулярный полиморфизм и хромосомная локализация генов утилизации лактозы (*LAC*) соответственно. Молочные штаммы так же сравнивали по ферментационной активности на скорость сбраживания лактозы.

Таким образом, каждая из трёх экспериментальных глав представляет отдельное, завершённое исследование по темам: «Молекулярно-генетические особенности и селекция спиртовых штаммов *Saccharomyces cerevisiae*»; «Молекулярный полиморфизм β -фруктозидазных генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*»; «Молочные дрожжи-пробиотики рода *Kluyveromyces*». Каждое из этих исследований заканчивается обсуждением результатов, представленных в соответствующей главе.

Положения, выносимые на защиту, соответствуют перечисленным выше темам исследований и являются их кратким заключением.

В целом работа хорошо написана, но не лишена недостатков. Недостатки касаются использования методов, являющихся, по всей видимости, второстепенными для исследователя. Это определение ферментационной активности штаммов по количеству выделяемого углекислого газа, т.е. с помощью взвешивания колб. Использованный метод специально в диссертации не обсуждается, в отличие от методов молекулярной характеристики штаммов. В то же время известно, что дрожжи выделяют существенно больше углекислого газа при аэробном росте на глюкозе, чем при нехватке кислорода, когда начинает образовываться спирт. Поэтому использование этого метода может быть не совсем корректным для оценки ферментационной активности спиртовых штаммов.

Другой метод, представленный крайне лаконично, - это метод филогенетического анализа. В материалах и методах упоминается, что использовалась программа MEGA5. После этого идёт фраза, требующая расшифровки или коррекции перевода: «Индекса бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, подсчитывали для 1000 псевдореplik.». На рисунках 18 в диссертации и 6 в автореферате, где изображено одинаковое филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей β -фруктозидаз дрожжей, приводятся различные значения бутстрепа для одних и тех же групп. Так, в каких же пределах бутстрепа или индекса бутстрепа результаты достоверны?

В диссертации значительный объем экспериментальных данных представлен в виде текста, а так же содержится в сильно перегруженной таблице 1, где объединены все штаммы *Saccharomyces*, используемые в двух исследованиях, а также в заключении добавлен еще и штамм *Kluuyveromyces*. Я думаю, что проделанную работу было бы лучше проиллюстрировать с помощью отдельных таблиц.

Выводы, сделанные диссертантом, по каждому из разделов работы основаны на обширном экспериментальном материале, полностью отражают результаты работы и соответствуют поставленным в исследовании задачам.

Рецензируемая работа вносит вклад как в фундаментальную науку в области адаптивной эволюции ферментационных признаков, важных для науки и практики культивируемых дрожжей *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*, так в прикладные направления, касающиеся получения термоустойчивых спиртовых штаммов и селекции негенномодифицированных дрожжей-пробиотиков. Полученные Садыковой А. Ж. результаты могут быть использованы в учебных заведениях для подготовки специалистов в области генетики дрожжей, а так же в научно-исследовательских лабораториях генетико-селекционного и пищевого профилей.

Автореферат изложен на 27 страницах и полностью отражает содержание диссертации. Полученные результаты опубликованы в 8 печатных работах, включая 4 в рецензируемых журналах.

Не вызывает сомнений, что диссертационная работа Садыковой Айгуль Жомартовны «Генетические основы селекции ферментационных дрожжей *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*» полностью соответствует критериям, установленным в пунктах 9 и 10 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Садыкова Айгуль

Жомартовна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика».

Дорошенко Вера Георгиевна
Старший научный сотрудник ЗАО «НИИ Аджиномото-Генетика»
117545, Москва
1-й Дорожный проезд, д. 1, корп. 1
Тел.: (495) 780-3378 доб. (*) 502
E-mail: Vera_Doroshenko@agri.ru
Кандидат биол.наук, доцент

Дорошенко В. Г.

Подпись к.б.н., доцента Дорошенко В.Г. заверяю.
Зам. Ген. Директора ЗАО «НИИ Аджиномото-Генетика»,
канд. биол. наук

Рыбак К. В.

12 мая 2016 года