

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
и информатизации
ФГБОУ ВО «ВГУ» В. Н. Попов

« ____ » _____ 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
на диссертацию Садыковой Айгуль Жомартовны «Генетические основы селекции
ферментационных дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.02.07 – Генетика

Актуальность темы выполненной работы

Исследование генетических основ селекции ферментационных дрожжей исключительно важно для понимания механизмов адаптации организма к изменяющимся условиям среды, а также имеет большую значимость для интенсификации процесса промышленного производства спирта и для здорового питания человека.

Для данных целей представители родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*, учитывая их особую адаптивность метаболизма и, следовательно, неотъемлемую способность к оперативной регуляции задействованных в адаптации генов, являются наиболее удобными объектами для изучения. Понимание молекулярных механизмов селекции дрожжей имеет значительное прикладное значение, способствуя максимизации биосинтеза целенаправленных продуктов в биотехнологии.

В данном контексте диссертационная работа Садыковой Айгуль Жомартовны рассматривает актуальную научную проблему.

В соответствии с поставленной целью в работе можно выделить несколько логично взаимосвязанных частей. На первом этапе Садыковой А. Ж. были проведены исследования по изучению молекулярно-генетических и физиологических особенностей спиртовых штаммов *S. cerevisiae* и молекулярного полиморфизма генов, кодирующих β-фруктозидазу у дрожжей рода *Saccharomyces*, которые позволяют приблизиться к решению вопросов, связанных с изучением механизмов адаптации, увеличения ферментационной активности штаммов дрожжей, а также к вопросу о роли селекционного отбора в получении промышленно значимых штаммов дрожжей.

В связи с достижениями молекулярной биологии в последнее время все больше появляется работ, приводящих к реклассификации тех или иных микроорганизмов. Мировые коллекции микроорганизмов, в которых хранятся представители молочных дрожжей рода *Kluyveromyces*, нуждаются в уточнении их таксономического статуса. В связи с этим второй этап работы Садыковой А. Ж. был посвящен уточнению таксономического статуса представителей молочных дрожжей, имеющих свои молекулярно-биологические особенности, что позволяет целенаправленно выявлять штаммы, способные активно сбраживать лактозу.

Таким образом, проведенные автором исследования генетических основ селекции ферментационных дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* являются актуальными в области молекулярной биологии, промышленной генетики и таксономии ферментационных дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*.

Степень обоснованности, достоверность и новизна научных положений и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Для достижения цели исследования были поставлены адекватные задачи, которые удалось полностью решить с использованием широкого набора современных и классических физико-химических, микробиологических и молекулярно-генетических исследований.

Применение этих методов, а также использование широкого спектра штаммов дрожжей-сахаромицетов, в частности, *S. cerevisiae* и молочных дрожжей рода *Kluyveromyces* позволило автору получить новые данные о роли полимерных генов *SUC* и *MAL*, контролирующих ферментацию сахарозы и мальтозы, у спиртовых штаммов *S. cerevisiae* и с помощью разработанного автором нового метода на основе рестрикционного анализа провести кардинальную реидентификацию штаммов дрожжей *Kluyveromyces* из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Результаты диссертационной работы являются приоритетными. Научно-практическая значимость рукописи не вызывает сомнений.

С помощью ПЦР-ПДРФ-анализа 5.8S-ITS фрагментов рДНК, молекулярного кариотипирования и Саузерн-гибридизации изучены геномы 36 спиртовых штаммов. Несмотря на то, что все исследованные штаммы относятся к виду *S. cerevisiae*, автору удалось выявить значительный полиморфизм хромосомных ДНК.

Садыковой А. Ж. удалось показать наличие дополнительных хромосом, несущих гены *MAL* и *SUC*, у многих изученных ею спиртовых штаммов, что хорошо согласуется с предположением о анеуплоидности многих производственных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, то есть адаптация дрожжей в промышленных ферментациях обеспечивается за счет увеличения числа копий необходимых генов.

Основываясь на данных, подтверждающих, что повторяющиеся субтеломерные последовательности являются горячими точками внутри- и межхромосомных рекомбинационных событий, Садыкова А. Ж. провела сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *SUC*, кодирующих β -фруктозидазу у дрожжей рода *Saccharomyces* – у восьми теломерных генов (*SUC1*, *SUC3–SUC5*, *SUC7*, *SUC8*, *SUC9* и *SUC10*) и гена *SUCa* дрожжей *S. arboricola*. Анализ спектра нуклеотидных замен показал, что преобладают молчащие транзиции С → Т, большинство которых расположено в третьем положении кодона, а их аминокислотные последовательности сходны на 88–100 %. Наиболее дивергированы белки *SUCa* (*S. arboricola*) и *SUCb* (*S. bayanus*), уровень сходства которых с остальными белками *SUC* не превышает 92 %. Показано, что виды *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* имеют только по одной копии гена *SUC* и не накапливают полимерные гены, как это характерно для штаммов *S. cerevisiae* из промышленных популяций. На основании полученных результатов автор предполагает,

что субтеломерные повторы β -фруктозидазных генов *SUC* появились в геноме дрожжей *S. cerevisiae* под воздействием селекционного отбора в процессе их доместикации.

Как известно, высокотемпературная алкогольная ферментация является одним из способов удешевления и интенсификации промышленного получения этилового спирта. В этой связи, Садыковой А. Ж. на основании молекулярно-генетического скрининга дрожжей *S. cerevisiae* различного происхождения были отобраны штаммы, которые превосходили по ферментационной активности родительские культуры и были способны расти при повышенных температурах. Полученные результаты позволили показать, что межштаммовая гибридизация является эффективным методом селекции спиртовых штаммов *S. cerevisiae*, сочетающих термоустойчивость и высокую ферментационную активность.

Дрожжи *Kluuveromyces marxianus* и *Kl. lactis*, имея активность фермента β -галактозидазы, играют огромную роль в гидролизе β -галактозида – лактозы. Последний, находясь в пищевых молочных продуктах, из-за отсутствия у взрослых людей фермента β -галактозидазы может не усваиваться и может способствовать развитию вредной микрофлоры, приводящей к кишечным расстройствам и газообразованию. В связи с этим получение биопрепаратов на основе представителей рода *Kluuveromyces* является одной из важнейших задач в области здорового питания человека. Изучение таксономии представителей рода *Kluuveromyces* будет способствовать не только решению данной задачи, но и позволит внести существенный вклад в фундаментальные основы таксономии молочных дрожжей. Поскольку молочные дрожжи *Kl. marxianus* и *Kl. lactis* фенотипически очень схожи и не могут быть дифференцированы только на основании стандартных физиологических тестов, то применение молекулярных методов для идентификации дрожжей имеет первостепенное значение. В ходе выполнения настоящего исследования был разработан эффективный метод молекулярной дифференциации молочных дрожжей *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* на основе ПДРФ анализа некодирующих участков рДНК: ITS1-5.8S-ITS2 последовательности и межгенного спейсера IGS2. При этом процедура молекулярной идентификации штаммов занимает довольно короткое время - не более 2–4 дней.

Использованные молекулярные подходы позволили провести кардинальную реидентификацию отечественных молочных дрожжей *Kluuveromyces*, хранящихся во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ Пущино, Московская область). В частности, автору удалось с помощью молекулярного анализа показать, что большинство молочных штаммов с видовым названием *Kl. lactis* в действительности относятся к виду *Kl. marxianus*. Достоверность молекулярной дифференциации дрожжей *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* была также подтверждена молекулярным кариотипированием.

Структура и объем работы

Структура представленной диссертационной работы стандартна и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы (294 источника).

Обзор литературы, представленный в работе, достаточно полно освещает вопросы, касающиеся темы исследования. В обзоре рассмотрены особенности таксономии спиртовых дрожжей *Saccharomyces* и *Kluuveromyces*, состояние их современной классификации, а также методы, используемые для их идентификации. В главе

материалы и методы исследования все методики описаны достаточно подробно, что позволяет воспроизвести их. Применяемые методы адекватны поставленным задачам исследования. Работа проведена на современном уровне с использованием молекулярно-генетического подхода.

Приведенные в работе научные положения, выводы и рекомендации аргументированы, основаны на фундаментальных научных положениях, общепринятых теоретических закономерностях, опираются на экспериментальные данные и являются их логическим следствием. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

Значимость для науки и производства полученных автором диссертации результатов

Полученные результаты могут быть использованы в молекулярно-генетических исследованиях и селекционных разработках по спиртовым и молочным дрожжам.

Автором на основании молекулярно-генетического скрининга дрожжей *S. cerevisiae* было доказано, что для селекции спиртовых штаммов *S. cerevisiae*, которые одновременно могут сочетать термоустойчивость и высокую ферментационную активность, метод межштаммовой гибридизации является эффективным и его необходимо внедрять в предпроектируемую технологию.

Метод молекулярной дифференциации молочных дрожжей *Kl. lactis* и *Kl. marxianus*, разработанный автором, позволяет «навести порядок» в паспортизации штаммов *Kluyveromyces* в дрожжевых коллекциях, что очень важно для биотехнологии в области пищевой промышленности.

Представленная работа также вносит вклад в фундаментальную науку в области адаптивной эволюции ферментационных признаков, важных для науки и практики культивируемых дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

В целом, диссертация Садыковой А. Ж. является законченным научным исследованием, выполненном на высоком экспериментальном уровне и отличающимся новизной. Работу выгодно отличает методологическая аккуратность. Отдельного положительного отзыва заслуживает стиль изложения в диссертации: материал изложен очень структурированно, логично, грамотно, и очень удобен для восприятия.

Результаты диссертационной работы Садыковой А. Ж. могут быть использованы в научной работе, в учебном процессе при реализации учебных образовательных программ высшего профессионального образования по направлению генетика, молекулярная биология, микробиология, биотехнология.

В качестве замечаний по диссертационной работе необходимо отметить следующее:

1. Первое предложение «Молекулярно-генетические и физиологические особенности спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» в разделе «Положения, выносимые на защиту» не содержит глагола и вследствие этого не ясен смысл сказанного.

2. В автореферате отсутствует раздел «Объект и методы исследования». Как правило этот раздел приводится в автореферате, чтобы у читателя сложилось представление о научно-методическом уровне исследования.
3. Почему молекулярную идентификацию штаммов *Kluyveromyces lactis* и *Kl. marxianus* проводили на основе только одного признака (рестриктаза HindIII или AluI). Обычно для нормального генотипирования используют несколько признаков.

Указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы, не влияют на главные результаты работы и носят рекомендательный характер.

Результаты диссертационной работы обсуждались на всероссийских и международных съездах и конференциях и полноценно отражены в 8 публикациях, в том числе в 4 статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Заключение по диссертационной работе

Таким образом, диссертационная работа Садыковой А. Ж. является научно-квалификационной работой, в которой изложены научно-обоснованные технологические решения для получения функциональных продуктов питания, обеспечивающие реализацию в промышленных условиях конкурентоспособных технологий, что имеет существенное значение для эффективного развития перерабатывающих отраслей агропромышленного комплекса, а также социальное значение для обеспечения населения продуктами здорового питания.

Диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (редакция от 30.07.2014 г.), предъявляемых ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Садыкова Айгуль Жомартовна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.02.07 – Генетика.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры биохимии и физиологии клетки биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета (протокол № 4 от 5 мая 2016 года).

Профессор кафедры биохимии и физиологии клетки
биолого-почвенного факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»,
доктор биологических наук

М.Ю. Грабович

Почтовый адрес: 394006 г. Воронеж, Университетская пл., д. 1
Тел.: (473) 2208877
E-mail: margarita_grabov@mail.ru