



Российская академия наук
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
**ИНСТИТУТ
ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
МИКРООРГАНИЗМОВ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИЭГМ УрО РАН)**
Голева ул., д. 13, г. Пермь, 614081
тел. (342) 280-74-42, факс (342) 280-92-11
e-mail: info@iegm.ru
ИНН/КПП 5902290353/590301001

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки
Института экологии и генетики
микроорганизмов
Уральского отделения Российской
академии наук,
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор


В.А. Демаков
7 мая 2015 г.



12.05.2015 № 16357-9311/162

На № _____

Отзыв ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук о теоретической и практической ценности диссертации
Новотоцкой-Власовой Ксении Александровны
«Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов,
выделенных из многолетнемерзлых осадков»,
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

1. Актуальность темы диссертации

В последние десятилетия наблюдается все больший интерес к изучению психрофильных/психротолерантных микроорганизмов, в том числе для выяснения механизмов выживаемости при длительном нахождении в условиях отрицательных температур. Микроорганизмы, выделенные из многолетнемерзлых пород Арктики и Антарктики, являются уникальными объектами для понимания происходящих биологических (метаболических) процессов при экстремально низких температурах. В ходе многочисленных работ зарубежных и отечественных исследователей из мерзлых грунтов, криопэгов (высокоминерализованных подземных вод с постоянной отрицательной температурой) были выделены и охарактеризованы многие микроорганизмы – бактерии, зеленые водоросли, археи, дрожжи, микромицеты, протисты. Молекулярные компоненты клеток таких организмов, и в первую очередь

белки (ферменты), должны обладать структурно-функциональными особенностями, обеспечивающими сохранение метаболической активности в условиях отрицательной температуры. Диссертация Новотоцкой-Власовой Ксении Александровны посвящена решению этой актуальной проблемы и направлена на поиск специфических особенностей ферментов микроорганизмов из вечной мерзлоты, обеспечивающих их адаптацию к экстремальным условиям существования, на примере липолитических ферментов.

2. Новизна исследования, степень обоснованности полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором впервые проведена оценка наличия липолитической активности у микроорганизмов, выделенных из отрицательнотемпературных рассолов (криопэгов) в вечной мерзлоте. Выделены и частично охарактеризованы чистые культуры бактерий, обладающих липолитической активностью.

Впервые выделены и изучены липолитические ферменты психроактивной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T, выделенной из арктического криопэга. Показано, что выделенные липолитические ферменты EstPc, Lip1Pc и Lip2Pc являются холодоактивными и обладают рядом уникальных свойств.

Диссертационная работа К.А. Новотоцкой-Власовой построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, главы собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы. В работе приведен список используемых сокращений. Работа изложена на 171 странице машинописного текста, иллюстрирована 30 таблицами и 42 рисунками. Работа написана автором лично, изложена хорошим литературным языком. Список использованной литературы включает 283 наименования, из которых 267 ссылок на иностранном языке.

Во введении обосновывается актуальность проводимых исследований, а также научная новизна и научно-практическая значимость работы.

Обзор литературы, представленный на 42 страницах, свидетельствует о хорошем знании диссертантом публикаций по теме работы. Обзор включает три отдельные главы. Первая и вторая главы посвящены изучению биоразнообразия микроорганизмов в многолетнемерзлых породах, криопэгах и механизмам адаптации бактерий к низким температурам. В третьей главе обзора приведены сведения о

классификации, структуре и свойствах, методах определения и применении в биотехнологии холодоактивных липолитических ферментов. Отдельный раздел обзора посвящен бактериям рода *Psychrobacter* - группе микроорганизмов, часто выделяемой из холодных местообитаний, в том числе из криопэгов. Отмечается, что для многих видов этого рода показано наличие липолитических ферментов, включая холодоактивные. Поэтому представители этого рода являются перспективной группой психроактивных бактерий для обнаружения и изучения липолитических ферментов. Таким образом, сведения о психрофильных бактериях и холодоактивных липазах, приведенные соискателем в главах обзора литературы, логично обосновывают цель и задачи диссертационной работы.

В экспериментальной части (Глава 4 «Материалы и методы исследования») диссертационной работы К.А. Новотоцкой-Власовой подробно описаны разнообразные классические и современные микробиологические, молекулярно-биологические и биоинформатические методы. Так, в работе использованы современные методы выделения геномной ДНК из биомассы бактерий, методы амплификации (ПЦР) генов 16S рРНК и генов липолитических ферментов, секвенирования и анализа полученных нуклеотидных последовательностей, а также целый набор молекулярно-генетических и биохимических методов для получения и характеристики рекомбинантных белков (липолитических ферментов).

Полученные автором экспериментальные данные изложены в Главе 5 «Результаты и обсуждение», содержащей три раздела.

В первом разделе приводятся результаты исследований, которые позволяют утверждать, что криопэги вечной мерзлоты содержат большое количество видов микроорганизмов, обладающих липолитической активностью в условиях пониженной температуры и высокой солености. Создана коллекция психротолерантных микроорганизмов, выделенных из криопэгов Колымской низменности, Аляски и полуострова Ямал - потенциальных продуцентов холодоактивных липолитических ферментов, и изучены их морфологические, физиолого-биохимические характеристики. Филогенетический анализ с использованием данных секвенирования последовательностей генов 16S рРНК показал, что выделенные бактерии принадлежат к двум основным филумам *Actinobacteria* (родам *Brevibacterium*, *Citricoccus*, *Kocuria*, и *Dietzia*) и *Firmicutes* (родам *Lactigenium* и *Bacillus*). Изучение

липолитической активности выделенных бактерий продемонстрировало наличие у них липолитических ферментов с различной субстратной специфичностью.

Во втором и третьем разделах представлены результаты изучения липолитической системы психрофильного штамма *Psychrobacter cryohalolentis*, выделенного ранее из криопэга Колымской низменности (Bakermans et al., 2006). Показано наличие как внеклеточной, так и внутриклеточной липолитической активности у этого микроорганизма. При понижении температуры культивирования наблюдалось увеличение липолитической активности, что позволило предположить наличие у *P. cryohalolentis* холодоактивных липолитических ферментов. На основании имеющихся данных полногеномного секвенирования с помощью методов биоинформатики смоделирована липолитическая система этого микроорганизма, включающая внутриклеточные и внеклеточные липолитические ферменты с различной субстратной специфичностью. Сконструированы эффективные системы экспрессии в клетках *E. coli* потенциальных холодоактивных липолитических ферментов *P. cryohalolentis* и разработаны методики их выделения и рефолдинга. Выделенные ферменты подробно охарактеризованы. Установлено, что EstPc является относительно термостабильной эстеразой, обладающей высокой активностью при низких температурах, Lip1Pc - липазой, способной эффективно утилизировать при пониженных температурах субстраты с длиной углеводородной цепи C10-C12, а Lip2Pc - холодоактивным липолитическим ферментом, способным утилизировать субстраты с длиной углеводородной цепи C14-C16 и обладающим относительно высокой термостабильностью. Выявленные свойства липолитических ферментов *P. cryohalolentis* существенно отличают эти ферменты от ранее изученных холодоактивных биокатализаторов и делают их интересными объектами для структурно-функциональных исследований и биотехнологического использования. Кроме того, результаты работы позволяют утверждать, что криопэги Арктики являются перспективным источником для получения штаммов-продуцентов ферментов, в частности, обладающих липолитической активностью при низких температурах.

В заключении отражены наиболее важные достижения диссертационной работы. Выводы, сделанные автором на основании полученных результатов, соответствуют

поставленным задачам, подтверждены экспериментальными и теоретическими материалами.

Результаты, приведенные в диссертационной работе, получены с применением комплекса современных микробиологических, молекулярно-биологических, биоинформатических методов, характеризуются воспроизводимостью и достоверностью.

Представленные в диссертации материалы опубликованы в 19-ти печатных работах, в том числе в 2-х статьях в журналах, рекомендованных ВАК («Биохимия» и «Доклады Академии Наук»), 2-х статьях в зарубежных рецензируемых журналах («FEMS Microbiology Ecology», «Protein Expression and Purification»), патенте РФ и 14 тезисах российских и международных конференций.

3. Значимость полученных результатов для науки и практики

Полученные автором результаты вносят существенный вклад в понимание основных механизмов адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям существования, выживанию при отрицательных температурах. Полученные и охарактеризованные липолитические ферменты психрофильного штамма *Psychrobacter cryohalolentis* могут быть использованы для биотехнологических целей в пищевой промышленности, в легкой промышленности, в тонком химическом синтезе и при биоремедиации сточных вод и почв. Обычно продуцентами холодоактивных ферментов являются микроорганизмы - психрофилы, чей температурный оптимум лежит ниже 15°C. Исследователи этих ферментов часто сталкиваются с проблемой их нестабильности при более высоких температурах. Результаты, полученные диссертантом, показали, что ферменты EstPc и Lip2Pc обладают не только высокой активностью при низких температурах, но и повышенной термостабильностью при относительно высоких температурах, что делает их перспективными для применения в различных областях промышленности.

4. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в организациях биологического и биотехнологического профилей, занимающихся исследованием генетического, биохимического, биотехнологического потенциала экстремофильных организмов. Полученные

результаты представляют значительный интерес для использования при чтении лекций по молекулярной микробиологии и экологии, биохимии, биоинформатике и биотехнологии в ВУЗах.

В ходе прочтения диссертации и автореферата возникли некоторые **вопросы и замечания:**

1. В названии работы обозначены «микроорганизмы, выделенные из многолетнемерзлых осадков», но в основных разделах диссертационной работы («Экспериментальная часть», «Заключение», «Выводы») приводятся данные о бактериях, выделенных только из «переохлажденных высокоминерализованных вод в толще вечной мерзлоты (криопэгов)»?

2. В тексте диссертации (особенно в главе 4 «Материалы и методы исследования», стр. 62-74) встречаются пунктуационные погрешности и опечатки.

3. В подписях к рисункам 15, 16, 23, 24, 30, 35-38 не приведены названия маркеров молекулярного веса белков (фирма-производитель, страна).

Перечисленные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Диссертация Новотоцкой-Власовой Ксении Александровны «Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых осадков», представленная на соискание степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач микробиологии экстремофильных (психрофильных) прокариот: выделены и охарактеризованы бактерии из криопэгов в вечной мерзлоте, обладающие липолитической активностью; исследованы холодоактивные липолитические ферменты (EstPc, Lip1Pc и Lip2Pc) психрофильной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T, что имеет существенное значение для микробиологии, молекулярной биологии и биотехнологии. Диссертационная работа соответствует специальности 03.02.03 – микробиология, удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемых к

кандидатским диссертациям, а ее автор – Новотоцкая-Власова Ксения Александровна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Работа рассмотрена и обсуждена на семинаре лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (протокол № 2 от 5 мая 2015 г.).

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной
микробиологии и биотехнологии

Елена Генриховна Плотникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук,
614081, Пермь, ул. Голева, 13.
E-mail: info@iegm.ru; peg@iegm.ru
Телефоны: 8 (342)280 74 42; 8 (342)280 84 31

Подпись Е.Г. Плотниковой заверяю
Ученый секретарь
Института экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН



Козлов С.В.