

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОПОНЕНТА

на диссертационную работу Новотоцкой-Власовой Ксении Александровны
«Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов,
выделенных из многолетнемерзлых осадков»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.02.03 – микробиология

Основная часть диссертационной работы Ксении Александровны Новотоцкой-Власовой посвящена подробному и всестороннему изучению в своем роде уникальных холодоактивных липолитических ферментов выявленных в ходе работы в геноме психроактивного штамма *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T, выделенного из низкотемпературного рассола (криопэга), локализованного в «вечной» мерзлоте. Кроме того в ходе выполнения работы Новотоцкой-Власовой из арктических криопэгов была выделена коллекция бактерий, обладающих липолитической активностью, и проведена идентификация этих штаммов.

Синтез холодоактивных ферментов является одним из ключевых адаптивных стратегий психротрофных и психрофильных бактерий. Кроме того, благодаря высокой каталитической активности при низких температурах, холодоактивные ферменты востребованы в качестве добавок к моющим средствам, биокатализаторов для биотрансформации лабильных соединений при низких температурах, и биоремедиации загрязненных почв и сточных вод при низких и умеренных температурах.

Актуальность темы диссертации

Для многолетнемерзлых отложений полярных областей Земли характерны уникальные условия, в частности, отрицательная температура в течение геологически длительных периодов, низкая активность воды, слабая доступность органических веществ, минимальная скорость диффузии и длительное воздействие гамма-радиации от минералов вмещающих пород. Именно поэтому в настоящее время микроорганизмы, естественным образом законсервированные в многолетнемерзлых отложениях Арктики и Антарктиды, являются объектами биологических исследований самых разных направлений.

Из многолетнемерзлых отложений различного возраста и генезиса выделены и описаны бактерии различных таксономических групп, которые сохранили жизнеспособность и обладали способностью к росту в широком диапазоне температур (от -5 до $+40^{\circ}\text{C}$) после естественной криоконсервации на протяжении до 3-х миллионов лет. В связи с этим одним из актуальных направлений исследований является выяснение механизмов адаптации и выживаемости микроорганизмов из многолетнемерзлых отложений. Для решения этой задачи необходимо установить, каким образом клетки микроорганизмов из мерзлоты обеспечивают активный метаболизм и размножение в широком температурном диапазоне, а также поддержание жизнедеятельности при длительном нахождении при отрицательных температурах. Молекулярные исследования данной проблемы способствуют расширению понимания механизмов адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям, а также определению возможных пространственных и временных границ существования жизни не только на Земле, но и на других планетах и космических телах криогенного типа. Таким образом, исследование молекулярных основ адаптации метаболизма бактерий к экстремальным условиям является весьма актуальным направлением фундаментальной науки. С другой стороны, поиск холодоактивных ферментов, в том числе и липолитических, с целью их дальнейшего практического использования в различных промышленных производствах, а также при биоремедиации сточных вод и почв, также является актуальным направлением исследований.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

На основании результатов проведенных исследований и последующего их всестороннего анализа автором работы сделано 6 выводов. Выводы диссертации Новотоцкой-Власовой К.А. основаны на огромном экспериментальном материале. Работа выполнена на высоком профессиональном уровне с использованием как самых современных методов и подходов молекулярной биологии, биохимии и биоинформатики, так и классических микробиологических методов. Проведена необходимая статистическая обработка полученных экспериментальных данных. Достоверность каждого результата и выводов диссертационной работы не вызывает сомнений.

Научная новизна диссертационной работы Новотоцкой-Власовой К.А. обусловлена уникальностью выбранных объектов исследования: холодоактивных липолитических ферментов бактерий, обитающих в переохлажденных высокоминерализованных водах в толще вечной мерзлоты (криопэгов) Колымской низменности, Аляски и полуострова

Ямал. Никто ранее не проводил подобных исследований. Благодаря этому диссертанту впервые удалось выделить из отрицательнотемпературных рассолов чистые культуры бактерий, обладающих липолитической активностью, и частично их охарактеризовать. Изучение липолитической активности выделенных штаммов продемонстрировало наличие у них липолитических ферментов с различной субстратной специфичностью. В результате удалось создать коллекцию психротолерантных галофильных микроорганизмов - потенциальных продуцентов холодоактивных липолитических ферментов.

Кроме того впервые проведено исследование липолитической системы психроактивного штамма *P. cryohalolentis* K5^T, также выделенного из арктического криопэга. Продемонстрировано наличие как внеклеточной, так и внутриклеточной липолитической активности у этого микроорганизма. В ходе работы у штамма *P. cryohalolentis* K5^T удалось не только предсказать с помощью биоинформатического анализа полной нуклеотидной последовательности генома три ранее неохарактеризованных липолитических фермента – две липазы (*lip1Pc*, *lip2Pc*) и одну эстеразу (*EstPc*) –, но и отработать методы эффективного выделения чистых белков, а также показать, что они обладают рядом свойств, отличающих их от ранее описанных холодоактивных липолитических ферментов. Так все три фермента отличаются высокой активностью в широком диапазоне температур, устойчивостью к воздействию ряда органических растворителей и ионов металлов, а два фермента (эстераза *EstPc* и липаза *Lip2Pc*) еще и относительно высокой термостабильностью. Такие свойства этих липолитических ферментов делают их перспективными объектами для дальнейших структурно-функциональных исследований и практического применения

Результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что криопэги содержат большое количество видов микроорганизмов, обладающих липолитической активностью, и поэтому являются перспективным источником для получения штаммов-продуцентов ферментов, в частности липолитических, обладающих активностью при низких температурах и повышенной солености.

2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

Одним из главных достоинств работы является то, что диссертантом осуществлены не только выделение и всесторонняя детальная характеристика липолитических ферментов, но и проведен анализ связи различных свойств ферментов с их ролью в

метаболизме и обеспечении адаптационных возможностей хозяйского штамма, что позволило создать схему функционирования липолитической системы исследуемого штамма. Отдельно необходимо отметить скрупулезно выработанную в ходе выполнения диссертационной работы уникальную методику рефолдинга липазы Lip2Pc с помощью соответствующей фолдазы LipPc. Данная методика может быть использована для рефолдинга и других липолитических ферментов, протекающего с участием стерических шаперонов.

Результаты диссертационной работы Ксении Александровны Новотоцкой-Власовой не только способствуют пониманию молекулярных механизмов адаптации бактерий к экстремальным условиям обитания, но и могут найти практическое применение. Продуцентами ранее изученных холодоактивных ферментов являлись микроорганизмы с температурным оптимумом роста ниже +15°C. Ферменты, выделенные из таких организмов часто являются нестабильными при более высоких температурах. Липолитические ферменты EstPc и Lip2Pc, полученные и исследованные в работе Новотоцкой-Власовой К.А., обладают не только высокой активностью при низких температурах, но и повышенной термостабильностью при относительно высоких температурах, что делает их перспективными для использования в пищевой промышленности, в легкой промышленности, в тонком химическом синтезе и при биоремедиации сточных вод и почв.

3. Содержание диссертации

Диссертационная работа Новотоцкой-Власовой К.А. написана по традиционному плану, изложена на 171 странице и содержит список используемых сокращений, введение, обзор литературы, экспериментальную часть, включающую описание материалов и методов, использованных в работе, результатов и их обсуждения, заключение, выводы и список литературы, включающий 283 источника. Диссертация представляет собой законченное научное исследование, содержит 42 рисунка и 30 таблиц.

Цели, задачи, актуальность и практическая значимость исследования изложены во введении. В диссертации представлен обзор литературных данных, охватывающий широкий круг вопросов, так или иначе связанных с экспериментальной частью диссертации. Отдельные разделы обзора посвящены описанию криобиосферы, как среды обитания микроорганизмов современных и изложению современных представлений о механизмах адаптации прокариот к низким температурам. Особое внимание уделено

биохимическим и структурным свойствам холодоактивных липолитических ферментов, а также вопросам их классификации и практического использования.

В диссертации приведено исчерпывающее описание проанализированных образцов и полностью изложены все методы, использованные для получения и последующей обработки экспериментальных данных. Описание применявшихся методов позволяет повторить их в работах другими коллективами исследователей.

Объем экспериментальной работы, выполненной диссертантом, очень велик. Все этапы экспериментальной работы четко и детально изложены, достоверность результатов подтверждена в сериях независимых опытов. Скрининг выделенных из криопэггов бактерий на наличие липолитической активности определяли общепринятыми методами (по появлению флюоресцирующего окрашивания штриха на чашках, содержащих родамин В и образованию гало на чашках с трибутирином). Идентификацию выделенных штаммов проводили на основании анализа последовательностей генов 16S рРНК. Идентификацию потенциальных генов липолитических ферментов в геноме *P. cryohalolentis* K5^T, а также предсказание третичной структуры белков и моделирование липолитической системы этого штамма проводили с использованием методов биоинформатики. Гены всех предсказанных белков были амплифицированы с помощью праймеров, разработанных в ходе данной работы, и клонированы в экспрессионный вектор. Для получения рекомбинантных белков была разработана система экспрессии их генов в клетках *E. coli* и последующей очистки с помощью Ni-аффинная хроматографии. Характеристику липолитических свойств белков проводили спектрофотометрическим методом с использованием в качестве субстрата *n*-нитрофениловых эфиров жирных кислот. Были исследованы удельная и субстратная специфичности белков, активность в зависимости от рН и температуры, стабильность при различной температуре и в присутствии различных металл-ионов, детергентов и органических растворителей. Для липазы Lip2Pc была специально разработана методика рефолдинга с помощью соответствующей фолдазы L1fPc.

Обоснованность и достоверность полученных Новотоцкой-Власовой К.А. данных не вызывает сомнения.

Выводы диссертации, выносимые на защиту, базируются на результатах работы, обоснованы и достоверны.

В целом работа написана хорошим литературным языком с очень небольшим количеством опечаток. Существенных недостатков у рассмотренной работы не выявлено, однако к ней имеется ряд мелких замечаний. В тексте диссертации встречаются неудачно сформулированные фразы, что приводит к неоднозначному толкованию их смысла. Автор

использует слово «филум» вместо более корректного термина «тип». В обзоре литературы не достаточно четко изложена система классификации липолитических ферментов. Кроме того очень облегчил бы понимание изложения результатов диссертации цветной рисунок со схематическим изображением структуры липаз и указанием на ней местоположения активного центра и кармана связывания жирных кислот. Несколько сумбурно изложен методический раздел. К тому же было бы весьма желательно привести в нем структурные формулы использовавшихся субстратов. При описании и обобщении результатов очень не хватает сводных таблиц со сравнением различных свойств исследованных в данной работе и ранее известных белков.

Очевидно, что все отмеченные недостатки рассматриваемой диссертации относятся к ее оформлению и не влияют на общую высокую оценку работы выполненной Новотоцкой-Власовой К.А.

4. Опубликование результатов диссертации в научной печати

Материалы диссертационной работы в достаточной степени отражены в 2 статьях, опубликованных в Российских центральных научных журналах рекомендованных ВАК АК МОН РФ, и в 2 высокорейтинговых зарубежных журналах. По результатам работы был получен один патент. Материалы диссертации многократно представлялись Новотоцкой-Власовой К.А. на международных и отечественных конференциях.

5. Содержание автореферата

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

6. Заключение

Диссертационная работа Новотоцкой-Власовой К.А. «Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых осадков» имеет важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов микробиологии и биохимии микроорганизмов и отвечает всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических

наук, а ее автор Новотоцкая-Власова Ксения Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующая Сектором анализа и хранения микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Институт молекулярной генетики» Российской академии наук
(123182, Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2,
www.img.ras.ru, тел 8(499)196-0000,
e-mail оппонента: petrova@img.ras.ru)
доктор биологических наук

Петрова Майя Александровна

Подпись д.б.н. Петровой М.А. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Институт
молекулярной генетики» РАН
кандидат биологических наук



Андреева Людмила Евгеньевна

6 мая 2015 года