

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр
Российской академии наук»
Казанский институт биохимии и биофизики -
обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр
Российской академии наук»
ул. Академика Арбузова, д.8, литера Р, Казань,
420088

для писем: а/я 30, Казань, 420111
тел./факс (843) 292-73-47
e-mail: kibmail@kibb.knc.ru
ОКПО 20438885 ОГРН 1021602842359
ИНН/КПП 1655022127/166045005

N

На N _____

УТВЕРЖДАЮ:

ВрИО руководителя Казанского института
биохимии и биофизики – обособленного
структурного подразделения Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки «Федеральный исследовательский
центр «Казанский научный центр
Российской академии наук»

проф., д.б.н.

В.М. Чернов

«28» января 2017

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертации Петушковой (Лавриненко) Екатерины Павловны «Ассимиляция ацетата пурпурной несерной бактерий *Rhodobacter capsulatus* B10», представленной на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология

1. Актуальность избранной темы

Пурпурные несерные бактерии являются перспективными продуцентами значимых с практической точки зрения соединений, в том числе молекулярного водорода, который в настоящее время рассматривается как экологически чистый возобновляемый источник энергии. Образование водорода данной группой бактерий происходит с участием нитрогеназы при фотоброжении глюкозы и окислении простых жирных кислот в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) в процессе анаэробного фотосинтеза. Выделение водорода пурпурными несерными бактериями происходит с более высокими скоростями, по сравнению с другими фотосинтезирующими микроорганизмами. Тем не менее, практическая реализация данного процесса требует повышения эффективности преобразования энергии света и органических субстратов в биоводород. По задумке автора полученные фундаментальные данные о последовательностях реакций, задействованных при ассимиляции ацетата (наиболее рентабельного углеродного субстрата), позволят разработать подходы для повышения эффективности его преобразования в водород за счет регулирования активности этих метаболических путей. В этой связи вполне очевидна актуальность темы диссертационной работы Е.П. Петушковой (Лавриненко), посвященной исследованию путей ассимиляции ацетата у пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus*. Кроме того, автор приводит достаточно аргументов, демонстрирующих наличие нерешенных вопросов относительно понимания механизмов ассимиляции ацетата у данной бактерии.

2. Связь работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Е.П. Петушковой (Лавриненко) относится к приоритетному направлению развития науки, технологий и техники «Науки о жизни», вписываясь в критическую технологию «Технологии новых и возобновляемых источников

энергии, включая водородную энергетику», утвержденные Указом Президента №899 от 7.07.2011г. Данная работа проводилась в 2015-2017 гг. в рамках темы: «Природный и искусственный фотосинтез для получения энергоносителей» при финансовой поддержке РНФ (№ 15-14-30007).

3. Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором впервые показано, что активность ключевого фермента глиоксилатного пути – наиболее распространенного пути восполнения пула интермедиатов ЦТК – изоцитратлиазы (ИЦЛ), в культурах *Rba. capsulatus* зависит от нескольких факторов: от вида используемого субстрата; от фазы роста культуры; от времени пребывания инокулята в стационарной фазе роста перед пересевом на среду с ацетатом; от вида субстрата, на котором рос инокулят. Петушковой (Лавриненко) Е.П. было продемонстрировано, что рост бактерии на среде с ацетатом в отсутствие активного глиоксилатного шунта осуществляется не за счет накопленных клетками при росте на среде с лактатом запасных углеводов, а за счет функционирования альтернативных анаэробических путей ассимиляции ацетата.

Автором была создана единая метаболическая схема путей восполнения пула щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) в ЦТК, необходимых прокариотам при использовании ацетата в качестве единственного источника углерода. Схема включает известные и новые пути восполнения ЩУК в ЦТК, которые впервые были классифицированы автором по образуемому в них метаболиту, через который происходит восполнение пула ЩУК и предшественников ЩУК в ЦТК. Автором были определены имеющиеся у *Rba. capsulatus* гены, кодирующие ферменты путей восполнения пула ЩУК в ЦТК. Опираясь на общедоступные данные о результатах транскриптомных анализов, показано транскрипты каких из обнаруженных генов синтезируются у *Rba. capsulatus* при фототрофном росте на среде с ацетатом в анаэробных условиях.

4. Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов

Созданная Петушковой Е.П. метаболическая схема путей восполнения пула интермедиатов ЦТК при росте с использованием ацетата не связана с метаболизмом какой-то конкретной бактерии, поэтому (в совокупности с данными о ферментах-аналогах, представленными в тексте и таблицах) может служить первичной информацией для изучения метаболизма ацетата у прокариот, относящихся к различным систематическим группам. Полученные данные о путях, детерминированных геномом *Rba. capsulatus*, существенно дополняют имеющиеся метаболические схемы ассимиляции ацетата этой бактерии, что позволит более точно прогнозировать влияние различных факторов внешней среды на рост и производительность биоводорода культурами, растущими на среде с ацетатом.

5. Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты проведенных Петушковой (Лавриненко) Е.П. исследований могут послужить основой для предсказания ряда модификаций генома *Rba. capsulatus*, которые могут привести к повышению эффективности преобразования ацетата в биоводород или увеличению производительности данной бактерией полигидроксиспиртов, как ценного сырья для производства биodeградебельных пластиков.

6. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

В ходе проведенного исследования Е.П. Петушковой (Лавриненко) получен систематизированный экспериментальный материал; цели и задачи, поставленные в диссертации, выполнены полностью. Выводы основаны на большом количестве и грамотной математической обработке экспериментальных данных и сомнений не вызывают; результаты работы не противоречат известным литературным данным.

7. Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа Петушковой (Лавриненко) Е.П. построена вполне традиционно и включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и обширный список используемой литературы (288 источников).

В разделе «Обзор литературы» представлены систематическое положение объекта исследований, краткая характеристика пурпурных несерных бактерий, а также рассмотрены пути углеродного метаболизма бактерий. В отдельной главе обстоятельно рассмотрены последовательности реакций известных на момент исследования анаэробных путей, позволяющих осуществлять восполнение пула метаболитов ЦТК при использовании культурами в качестве единственного источника углерода ацетата. Следующая глава посвящена обзору современных методов, которые применяются при изучении углеродного метаболизма бактерий, обозначена и обоснована необходимость системного подхода при проведении подобных исследований. Заключительный раздел обзора литературы раскрывает практическую значимость ожидаемых результатов запланированных исследований. В целом, обзор литературных источников является хорошим введением к задачам работы и предпосылкой для осмысления полученных результатов.

Раздел «Материалы и методы» написан достаточно подробно, приводится описание условий роста, всех экспериментальных процедур и методов обработки полученных данных. Методический уровень проведенного исследования вполне соответствует мировым стандартам в данной области. Используемые диссертантом методы работы описаны детально и конкретно, методические подходы адекватны поставленным задачам, что во многом определило их успешное решение.

В разделе «Результаты и обсуждения» изложены экспериментальные данные, полученные автором при выполнении работы и краткие выводы по каждому эксперименту. Описание результатов эксперимента предваряется аргументацией поставленной задачи и логики проводимого анализа.

Показано, что при разрушении клеток в аэробных условиях ИЦЛ теряет активность вследствие окисления и протеолиза. С учетом полученных данных усовершенствован метод определения ИЦЛ активности в бесклеточных экстрактах *Rba. capsulatus*. Для сохранения ИЦЛ активности при разрушении клеток и в процессе хранения БЭ необходимо присутствие ДТ и ингибиторов протеаз.

Продemonстрировано, что инокулят культуры *Rba. capsulatus*, выросший на среде с лактатом, не обладал ИЦЛ активностью. ИЦЛ активность появлялась через 4 часа после начала роста бактерии на среде с ацетатом и достигала максимума в начале стационарной фазы и далее снижалась вплоть до нуля. В то же время при переходе *Rba. capsulatus* с роста на среде с ацетатом на рост в присутствии только лактата в новых клетках продолжается синтез активной ИЦЛ.

Выявлено, что ИЦЛ активность зависела от возраста инокулята: с увеличением возраста инокулята, максимальное значение ИЦЛ активности (измеренное в начале стационарной фазы роста опытной культуры) снижалось. Если инокулят находился в стационарной фазе роста более 5 часов, то ИЦЛ активность в опытной культуре в начале стационарной фазы роста не обнаруживалась.

Подтверждено, что потребление запасного клеточного вещества (гликогена), имеющее место при переходе от использования клетками лактата на ацетат не может объяснить рост культур в присутствии ацетата без ИЦЛ активности на протяжении 8-12 часов. Таким образом, в клетках *Rba. capsulatus* имеются иные анаэробные пути.

Авторами не выявлено влияния на проявление активности ИЦЛ в культурах *Rba. capsulatus* при росте на среде с ацетатом pH среды или дополнительно внесенного дрожжевого экстракта (0,1 г/л среды). При изучении влияния на активность фермента

интенсивности освещения клеток автором не удалось прийти к однозначным выводам, в связи с чем, для более детального выяснения этого вопроса требуются дополнительные исследования.

Применяя методические подходы системной биологии, авторы создали метаболическую схему путей восполнения пула ЦУК в ЦТК прокариот. При этом были обнаружены новые метаболические пути, а также выявлены закономерности, ставшие основополагающими для создания классификации путей восполнения пула ЦУК в ЦТК прокариот.

Установлены метаболические пути, имеющие генетический потенциал для функционирования у *Rba. capsulatus*. Используя общедоступные данные об экспрессионных профилях фототрофных ацетатных культур бактерии, показано, какие из этих путей активны на транскрипционном уровне.

В «Заключении» автор кратко подводит итоги проделанной работы, полученные данные сопоставляет с результатами работ других авторов, выдвигает предположения, которые могут по-разному объяснить некоторые из полученных результатов.

Выводы, сделанные автором на основании совокупности данных, представленных в работе, полностью обоснованы. Диссертация представляет собой цельную завершенную научно-исследовательскую работу, все этапы которой логично связаны. Рецензируемая работа изложена четким языком, практически лишена грамматических ошибок и опечаток.

При чтении диссертации возникли следующие вопросы и замечания:

1) В примечаниях к таблицам №6 и далее, содержащим данные о генах и транскриптах этих генов в ацетатных культурах *Rba. capsulatus*, допущена описка – указано, что разъяснение обозначений в таблицах необходимо смотреть в примечаниях к таблице №1, а не №5.

2) В примечаниях к таблицам №5-11 желательно было указать базу данных, являющуюся источником информации о транскриптах, и выходной номер этих данных. Эта информация приведена только в соответствующем разделе «материалов и методов».

3) На среде с лактатом в качестве источника углерода основным запасным веществом *Rba. capsulatus* является гликоген. Тем не менее, желательно было бы рассмотреть и теоретическую возможность участия путей восполнения интермедиатов ЦТК за счет другого типа запасного вещества – полигидроксиполаноатов.

Отмеченные замечания не снижают очевидную научно-практическую ценность рассматриваемой диссертации.

8. Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат достаточно полно отражает основные положения и результаты диссертационной работы.

9. Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертационной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях. По результатам работы было опубликовано 2 статьи в переводных научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

10. Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

В целом, по объему выполненных исследований, актуальности, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов рецензируемая работа

соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Тема диссертационной работы соответствует специальности 03.02.03 – Микробиология.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертация Е.П. Петушковой (Лавриненко) является научно-квалификационной работой, в которой впервые экспериментально разрешены существовавшие противоречия относительно возможности использования пурпурной несерной бактерией *Rba. capsulatus* B10 глиоксилатного шунта в присутствии ацетата как единственного источника углерода в процессе фотосинтетического роста. Кроме того, выявлены альтернативные ему пути восполнения пула ЦУК в ЦТК у данной бактерии. Полученные результаты имеют существенное значение для соответствующей отрасли знаний и подтверждают соответствие рассматриваемой работы требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 30.07.2014), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Е.П. Петушкова (Лавриненко), заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 — Микробиология.

Материалы диссертации рассмотрены на заседании лаборатории молекулярной биологии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН 26.12.2017, протокол №7.

Отзыв составил доктор биологических наук,
Зав. лабораторией молекулярной биологии
Казанского института биохимии и биофизики
– обособленного структурного подразделения
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Федеральный исследовательский
центр «Казанский научный центр Российской
академии наук»,



Гоголев Ю.В.

420111, г. Казань, ул. Лобачевского 2/31

+79179168381 gogolev.yuri@gmail.com

Личную подпись Ю.В. Гоголева заверяю

Ученый секретарь КИББ ФИЦ КазНЦ РАН

к.б.н.



И.Ю. Карпилова