



ООО «СибЭнзим»

630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12
E-mail: info@sibenzyme.ru
<http://www.sibenzyme.ru>

Тел.: (383) 333-49-91
Тел/Факс: (383) 333-68-53

ОТЗЫВ

официального оппонента Дегтярёва С.Х. на диссертационную работу Розанова Алексея Сергеевича «Биоразнообразие микробиологических геотермальных сообществ Прибайкалья и Камчатки - перспективных источников бактерий-продуцентов ферментов деструкции лигноцеллюлозы», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика»

Диссертационная работа Розанова А.С. посвящена изучению микробных сообществ, обитающих в высокотемпературных гидротермальных источниках, поиску среди них бактерий-продуцентов ферментов деструкции лигноцеллюлозы, клонированию выявленных ферментов и изучению их биохимических свойств. Актуальность работы не вызывает сомнений. Исследования микробиологического разнообразия природных гидротермальных вод важны с точки зрения экологии, а выявление новых штаммов термофильных бактерий и изучение продуцируемых ими ферментов является насущной необходимостью современной биотехнологии.

Диссертационная работа написана в традиционной форме. Она изложена на 145 страницах и включает 188 ссылок.

Диссертация состоит из семи разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы».

Во «Введении» автор дает краткое описание геотермальных микробных сообществ и обосновывает важность решения задачи переработки лигноцеллюлозной биомассы для

получения сахаров, формулирует цель диссертационной работы и те задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели. Также в этом разделе приведены данные, подтверждающие научную новизну работы, теоретическую и практическую значимость исследования, указаны положения, выносимые на защиту, и описан вклад автора.

Глава «Обзор литературы» состоит из пяти основных разделов. Первый раздел посвящен описанию гидротермальных микробных матов и методам исследования микроорганизмов путем определения нуклеотидной последовательности гена 16S рНК в ДНК как отдельных микроорганизмов, так и в препаратах суммарной ДНК, выделенной из природных изолятов. Во втором разделе приводятся примеры использования ферментов и микробов в биотехнологических производствах, и обосновывается перспективность использования лигноцеллюлозной биомассы как источника сахаров. Третий раздел посвящен описанию структуры лигноцеллюлозной биомассы, а в четвертом говорится о насекомых, грибах, бактериях и выделенных из них ферментных комплексах, осуществляющих гидролиз растительной биомассы в природе. В последнем разделе дано описание существующей на сегодня технологии гидролиза растительной биомассы, включая ее измельчение, химическую обработку и расщепление ферментными препаратами. По обзору есть следующие замечания. Стр.19, 12-ая строка сверху: «с использованием секвенирования 16S и 18S rRNA генов, дают более всеобъемлющую оценку микробиологического разнообразия». Ген 18S рНК присутствует исключительно в эукариотах и не может быть использован для оценки микробиологического разнообразия. Стр. 36. Последняя строка и часть предпоследней являются ошибкой оформления диссертации. К существенным замечаниям по литобзору можно отнести следующие: (1) в последнем разделе литобзора в таблице 1 перечислено более десяти различных методов предобработки биомассы, но в тексте описано только применение ионных жидкостей и нет сведений по другим методам; (2) отсутствие описания самих ионных жидкостей, а их названия даны лишь в сокращенном виде (стр. 38, строки 3 и 6 снизу); (3) в выводах по обзору литературы (стр. 40) не указаны в явном виде причины выбора для деструкции лигноцеллюлозы именно микробиологических ферментов, а не ферментных комплексов грибов или термитов.

В главе «Материалы и методы» приводится достаточно детальное описание методик, использованных в работе. Следует отметить, что для решения поставленных задач диссертантом был применён широкий спектр самых современных методов анализа

структуры ДНК и белков. По данной главе можно сделать следующие замечания: (1) стр. 42, строка 11 снизу: К является сокращением G или T, а не G или R; (2) стр. 50, строка 6 сверху: «таблице 6», а не «таблице 2»; (3) стр. 53, строка 7 сверху: в тексте «преципитировались» вместо «осаждались», (4) стр. 55, строка 9 снизу: в тексте «в стеклянных виалах» вместо «в стеклянных пробирках» и повтор «виал» в 4-ой строке снизу.

Глава «**Результаты и обсуждение**» включает шесть последовательных разделов исследования. В первом и самом большом разделе приводится описание 6-ти геотермальных источников Прибайкалья, где проводился отбор проб, и подробное описание 8-ми точек забора образцов из Гаргинского геотермального источника. Из полученных восьми образцов микробных обрастаний и матов была выделена ДНК и определена структура гена 16S рРНК в препарате метагеномной ДНК из каждого образца. Такой анализ позволил определить представительность различных типов микроорганизмов в данных образцах и, в том числе, установить, что основой микробного мата Гаргинского источника являются цианобактерии, а археи присутствуют только в обрастаниях на камнях вблизи выхода термальных вод. Второй раздел в основном посвящен описанию термального источника Заварзина в кальдере вулкана Узон в Кроноцком заповеднике на Камчатке и исследованию бактериального состава микробного мата из этого источника путем анализа данных метагеномного секвенирования гена 16S рРНК в препарате суммарной ДНК, выделенной из образца этого мата. Основой микробного мата источника Заварзина оказались бактерии типов *Caldiserica* и *Dictyoglomi*. В третьем разделе проведено выделение более 200 штаммов термофильных микроорганизмов и их определение, а также полногеномное секвенирование шести бактерий, относящихся ко всем трем установленным родам выделенных микробов. Следует отметить, что штамм *Geobacillus icigianus* G1W1T, выделенный из источника Заварзина на Камчатке, оказался новым видом бактерий, ранее не описанным. В геноме бактерий *G. stearothermophilus*, выделенных из Прибайкалья, автору удалось выявить оперон генов, участвующих в деструкции гемицеллюлозы. В четвертом разделе диссертационной работы описано клонирование четырех ферментов деструкции из этого оперона, а в пятом разделе - культивирование полученных рекомбинантных штаммов и выделение из них целевых ферментов: ксилан-1,4- β -ксилозидазы, эндо-1,4- β -ксиланазы, α -глюкуронидазы и α -L-арабинофуранозидазы. Наконец, в шестом разделе определена зависимость активности ферментов от температуры и pH реакционной среды, а также (для двух ферментов) от концентрации ионной жидкости. По главе «Результаты и обсуждение»

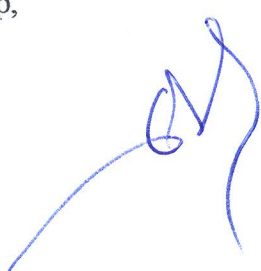
можно сделать следующие замечания: (1) стр. 85, рис.16 и стр. 86, строка 9 снизу указывают 12,7% как долю представителей Aquificae в микробном мате из источника Заварзина, тогда как в таблице 2 эта доля составляет 13,4%; (2) не понятно, как подсчитывались доли филогенетических групп бактерий в таблице 3, так как суммарно 100% получается только для архей в интегральной пробе; (3) стр. 92, второй абзац снизу, не приведены возможные объяснения отсутствия последовательностей гена 16S рРНК, установленных полногеномным секвенированием, в списке последовательностей, полученных в ходе метагеномного исследования; (4) в разделе 3 не указаны температуры культивирования выбранных шести штаммов бактерий; (5) в разделе 3 не обсуждается гомология структуры выявленных ферментов деградации лигноцеллюлозы с аналогичными белками, структура которых представлена в базе данных; (6) стр.109, рис.24, отсутствует нумерация дорожек; (7) стр. 116, рис.27, отсутствует обозначение одной из кривых. В «Заключении» достаточно полно и обосновано суммированы полученные результаты. «Выводы», сформулированные в диссертации, соответствуют полученным результатам. По «Заключению» и «Выводам» можно сделать следующие замечания: (1) стр. 122, строка 3 сверху: наличие лишней запятой; (2) последнее предложение вывода 1 излишне и лежит вне темы работы; (3) стр. 119, строка 15 сверху и стр.122, строка 16 сверху: указанная доля бактерий Aquificae (12,7%) не соответствует данным таблицы 2.

Диссертантом проделана большая, достаточно сложная в методическом исполнении работа. Достоверность представленных в диссертации результатов и обоснованность выводов не вызывают сомнений. Научная ценность и актуальность работы подтверждается шестью публикациями в научных изданиях, в том числе в журнале BMC Genomics, и одним патентом РФ. Материалы исследования апробированы на четырёх конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Абсолютное большинство замечаний по диссертации касаются оформления работы, а не её сути. Отмеченные недостатки не снижают значимости диссертационной работы как самостоятельного исследования.

Всё вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа Розанова Алексея Сергеевича, представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, как по содержанию, так и по оформлению соответствует установленным ВАК РФ (п. № 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней») требованиям к диссертациям, а сам Розанов А.С. достоин присуждения ему искомой степени по специальности 03.02.07 – генетика.

Дегтярёв Сергей Харитонович,
доктор биологических наук, профессор,
зам. директора по науке
ООО «СибЭнзайм».
Тел.: (383)-333-68-53
E.mail: degt@sibenzyme.com



Дегтярёв С.Х.

Подпись д.б.н. С.Х. Дегтярёва

ЗАВЕРЯЮ

Дубинин Евгений Викторович, к.э.н.,
директор ООО «СибЭнзайм»,



Дубинин Е.В.



20 мая 2016 г.