

## Отзыв

официального оппонента Аринбасаровой Анны Юрьевны на диссертационную работу Сековой Варвары Юрьевны «Основные физиолого-биохимические и молекулярные аспекты адаптации к стрессовым факторам у дрожжей *Yarrowia lipolytica*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - Биохимия.

### Актуальность темы диссертационного исследования

*Yarrowia lipolytica* – «нетрадиционные» дрожжи, имеющие большой биотехнологический потенциал. Они используются во многих отраслях промышленности: как продуцент органических кислот, белков, в том числе белков человека и животных, используемых в терапевтических целях. Эти дрожжи востребованы также в сельском хозяйстве, как компонент для биоремедиации почв и водных сред, в том числе морских вод, загрязнённых нефтепродуктами.

Биотехнологический потенциал *Y. lipolytica* на практике реализуется крайне недостаточно - можно указать лишь производство лимонной кислоты, повышение качества мясных и молочных продуктов, а также утилизацию гидрофобных отходов пищевых производств. Такая ситуация во многом обусловлена тем, что физиология этого микроорганизма остается недостаточно изученной, в частности, недостаточно изучены его адаптационные механизмы. Как известно, стрессовые воздействия, такие как кислотность среды, температура, лимитирование в среде какого-либо компонента питания или изменение условий аэрации, могут являться элементами регуляции биотехнологического процесса. Информация о физиолого-биохимических особенностях микроорганизма именно в стрессовых условиях позволяет оптимизировать процесс уже на стадии проектирования.

Геном *Y. lipolytica* полностью аннотирован, что предоставляет большие возможности для всестороннего изучения различных физиологических процессов в эукариотических клетках, в том числе, человека и животных. Дрожжи используются в качестве модели для фундаментальных исследований, при различных патологиях (в том числе, митохондриальных патологиях, связанных с функцией I комплекса дыхательной).

Наконец, распространенность *Y. lipolytica* в разных районах Земли, является опорным пунктом при изучении геномного разнообразия и адаптационной эволюции дрожжей.

Всё изложенное выше определяет актуальность исследования адаптивного ответа дрожжей *Y. lipolytica* на различные стрессовые воздействия.

#### **Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В рамках диссертационной работы получены следующие новые научные результаты:

1. Предложена экспериментальная модель культивирования *Y. lipolytica* W29 при комбинировании хронического теплового и щелочного стрессоров.
2. Показаны различия антиоксидантного статуса клеток *Y. lipolytica* W29 при культивировании в оптимальных и стрессовых условиях. Показано, что тепловое воздействие приводит к наиболее выраженному вовлечению антиоксидантных механизмов клеточной защиты.
3. Предложены концептуальные схемы изменений гликома и липидома клеток *Y. lipolytica* W29 при оптимальной температуре, а также при тепловом стрессовом воздействии.
4. Продемонстрировано снижение степени ненасыщенности жирных кислот мембранных кардиолипинов, а также расходование запасных триацилглицеридов клеток *Y. lipolytica* W29 из липидных капель в стрессовых условиях.



5. Проанализированы изменения протеома клеток *Y. lipolytica* W29 при тепловом и комбинированном стрессовых воздействиях.

6. Показано парадоксальное исчезновение экспрессии ряда факторов антиоксидантной защиты клеток при комбинированном стрессовом воздействии.

7. Продемонстрировано увеличение экспрессии митохондриального порина в условиях щелочного стресса, а также при комбинировании щелочного и окислительного стрессоров.

### **Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Достоверность результатов диссертационной работы Сековой В.Ю. обусловлена использованием современных биологических, биохимических и физико-химических методов, большим объемом экспериментальных данных. и их корректной статистической обработкой.

Положения, выносимые на защиту, аргументированы, выводы подтверждены экспериментальными данными и научно обоснованы, соответствуют содержанию работы.

### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Выявленные в ходе работы физиолого-биохимические закономерности адаптации *Y. lipolytica* W29 к различным видам стресса расширяют представления об адаптивном потенциале данного организма, в особенности, о способности к адаптации *Y. lipolytica* W29 к хроническому комбинированному стрессу (тепловому и щелочному). Полученное в исследованиях гликома *Y. lipolytica* W29 конститутивно высокое процентное содержание маннита в цитоплазме при оптимальных условиях позволяет рассматривать этот микроорганизм в качестве потенциального штамма-продуцента данного полиола. Индукция промотора гена митохондриального порина *VDAC* в трансформированной линии *Y. lipolytica* W29 при щелочном и

комбинированном стрессовых воздействиях делает перспективным его применение в качестве индуцибельного промотора для синтеза рекомбинантных белков.

#### **Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

По материалам диссертационной работы опубликовано 6 статей в российских и международных научных журналах, включённых в перечень ВАК, базы данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, а также два патента. Кроме того, опубликовано 14 работ в материалах всероссийских и международных конференций. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 19-04-00327-а и 19-34-80012).

#### **Личный вклад диссертанта**

Личный вклад диссертанта заключался в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

#### **Оценка содержания, завершённости и оформления диссертации**

Работа посвящена исследованиям физиолого-биохимических и молекулярных аспектов адаптивного ответа дрожжей *Y. Lipolytica W29* на стрессовые воздействия, такие как защелачивание и повышенная температура окружающей среды.

Автореферат и опубликованные статьи достаточно полно отражают содержание диссертационной работы.

Диссертация Сековой В.Ю. построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение и заключение. Работа изложена на 215 страницах и содержит 36 рисунков и 9 таблиц, а также одно приложение.



Список литературы включает 384 источника отечественной и зарубежной литературы.

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования основные положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор является информативным и обоснованным. Он включает в себя анализ актуальных и достоверных источников, логично структурирован и представлен в виде разделов, каждый из которых посвящен определенному аспекту адаптации клеток эукариот к неблагоприятным условиям с учетом существующих проблем и перспектив.

Раздел "Объект и методы исследования" содержит исходные данные о микроорганизме и описание методов, выбранных для выявления критериев и показателей адаптации дрожжей к стрессовым факторам. Следует отметить разнообразие примененных диссертантом современных методов и подходов, позволяющих оценить в том числе активности антиоксидантных ферментов, выживаемость, дыхательную активность клеток, провести анализ липидома и гликома, протеомный анализ. Для изучения индукции промотора гена митохондриального потенциал-зависимого порина VDAC была создана генетическая конструкция, несущая ген  $\beta$ -галактозидазы *Escherichia coli* под контролем промотора этого гена (POR1).

Раздел "Результаты и обсуждение" диссертационной работы включает подробное описание проведенного исследования, а также полученные данные в виде рисунков, графиков, таблиц, диаграмм и других графических материалов. Автор анализирует полученные данные и объясняет их с помощью литературных данных.

### Замечания

В целом оценивая работу положительно следует сделать следующие замечания:

- 1) В главе 3.1.1. Параметры роста культуры *Yarrowia lipolytica*

- Динамика накопления биомассы представлена некорректно: накопление биомассы определялось только по оптической плотности при длине волны, равной 590 нм ( $OP_{590}$ ).  $OP_{590}$  — это мутность, показывающая количество частиц в единице объема. Этот параметр не учитывает слипание клеток (агглютинацию), которая зависит от концентрации клеток, pH, температуры и т.д. Должны быть представлены результаты определения весовых характеристик собственно биомассы, например, по сухому весу, что позволяет более адекватно представить процесс роста.

2) Отсутствуют данные роста клеток в логарифмических координатах, без которых очень проблематично правильно определить (разграничить) фазы роста клеток (логарифмическую, стационарную и т.д.).

3) Результаты, представленные на рис. 2 (щелочные условия), предполагают двухфазный рост (2 лаг-фазы, 2 лог- фазы...). Автором пропущено это явление, которое является важным физиологическим аспектом приспособления микроорганизма к неблагоприятным условиям внешней среды, включающим, например, индукцию определенных ферментов.

4) Глава 3.2. Что касается анализа дыхательной активности клеток, то следовало бы более детально описать вклад альтернативной оксидазы в общее потребление кислорода клетками. Общее дыхание клеток не является просто суммой переноса электронов по основному и альтернативному пути.

5) В главу "Объект и методы исследования" автор забыл включить раздел «Статистическая обработка данных».

6) Замечания по формулировке выводов.

Вывод 1.

Что подразумевается под «долгосрочном действием» условий?

Вывод 3.

- Что значит «Специфическая устойчивость»?

- Уточнить: что подразумевается под «регуляцией окислительного фосфорилирования»? Изменялось ли изменение содержания АТФ в клетке?



Вывод 5. Эффект перекрёстной адаптации – это не смещение метаболизма в сторону противодействия какому - либо фактору.

Вывод 6.

-В чем универсальность указанных цитопротекторных белков в контексте данной работы? Имеет место только при адаптации клеток *Y. lipolytica* W29? Что известно про другие штаммы *Y. lipolytica*? Что известно про другие дрожжи? Имеет место только при адаптации клеток к исследованным стрессовым воздействиям?

7) Следует отметить присутствие в тексте достаточное количество неточностей, стилистических ошибок и опечаток.

- «Реакция на стресс». Стресс – это реакция организма на неблагоприятные факторы ...

-... были построены «кривые роста».....

- Использование термина «культура» в данном контексте некорректно, так как в работе используется один штамм.

- не совсем обосновано и часто используются термины «удобная модель», «уникальность», «универсальность».

Вопрос: В качестве объекта исследования использовали штамм *Y. lipolytica* W29 (дикий тип), полученный из коллекции CIRM-Levures collection (Франция). Надо обосновать - На каком основании был выбран именно этот штамм, какие у него особенности?

### **Заключение**

Несмотря на указанные недостатки, представленная диссертационная работа «Основные физиолого-биохимические и молекулярные аспекты адаптации к стрессовым факторам у дрожжей *Yarrowia lipolytica*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности по специальности 1.5.4 - Биохимия, выполненная под руководством Дерябиной Юлии Ивановны, является

законченной научно-квалификационной работой, которая по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации «842 от 24 сентября 2013 года (с редакции Постановлений Правительства Российской Федерации (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016, № 748 от 02 августа 2016, № 650 от 29 мая 2017, № 1024 от 28 августа 2017, № 1168 от 01 октября 2018, № 426 от 20 марта 2021, № 1539 от 11 сентября 2021, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26 мая 2020), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Варвара Юрьевна Секова, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - Биохимия.

**Официальный оппонент:**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)» (142290, Московская область, г. Пушкино, пр-кт Науки, 5; Телефон: +7-915-330-65-67, e-mail: aarin@rambler.ru)

Специальность, по которой оппонентом защищена диссертация:

1.5.11. Микробиология

кандидат биологических наук  Аринбасарова Анна Юрьевна

*Подпись А. Ю. Аринбасаровой заверяю:*

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук» (142290, Московская область, г. Пушкино, пр-кт Науки, 5; Телефон: +7-(4967) 73-08-44, e-mail: rta@ibpm.pushchino.ru

доктор биологических наук  
30.05.2023 г.



 Татьяна Анатольевна Решетилова