

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Лютовой Людмилы Владимировны на тему: «Таксономия и эволюционная генетика дрожжей *Kluuveromyces lactis*» по специальностям 1.5.18. – микология, 1.5.7. – генетика

Актуальность темы

В последние десятилетия перечень биотехнологических процессов, в которых используются дрожжевые грибы рода *Kluuveromyces*, значительно увеличился: они являются продуцентами β -галактозидаз, новых безлактозных продуктов функционального питания, гетерологичных белков медицинского и пищевого значения, киллерных токсинов (микоцины), которые являются биологическими агентами, подавляющими развитие вредных микроорганизмов.

Известно, что в процессе эволюции дрожжевые грибы утратили способность к образованию длинных гиф и мицелия, что было связано с переходом к обитанию в жидких и полужидких, богатых органическими веществами субстратах. Для некоторых представителей рода *Kluuveromyces* адаптация к обитанию в жидких и богатых органикой средах, вероятно, послужила появлению у них способности утилизировать дисахарид лактозу, которая содержит β -гликозидную связь, как и целлобиоза – используемый субстрат растительного происхождения. У дрожжей *Kluuveromyces* способность ферментировать лактозу контролируется сложным локусом *LAC*, состоящим из тесно сцепленных структурных генов *LAC4* (ген β -галактозидазы) и *LAC12* (ген пермеазы лактозы), и регуляторной последовательности. Это уникальная способность была обнаружена только у некоторых популяций *Kluuveromyces lactis* и *K. marxianus*.

Однако следует учитывать и установленный факт отсутствия у некоторых видов рода *Kluuveromyces*, таких как *K. dobzhanskii*, *K. starmeri* и *K. lactis* var. *drosophilorum* последовательностей генов *LAC*, следовательно, поэтому они не утилизируют лактозу. В то же время установлено, что у представителей видов *Kluuveromyces*, утилизирующих лактозу, неоднозначны

метаболические пути превращения продуктов ее гидролиза. Так, виды *K. aestuarii*, *K. siamensis*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii* и природные изоляты *K. marxianus* ассимилируют лактозу, но не способны ее включать в метаболические пути брожения.

Наличие гетерогенности популяций вида *K. lactis*, обозначенных как таксономические разновидности: молочные дрожжи *K. lactis* var. *lactis*, способные к утилизации лактозы, и природные штаммы *K. lactis* var. *drosophilorum*, неспособные утилизировать лактозу, обуславливает необходимость изучения происхождения лактозных генов разновидности *K. lactis* var. *lactis*, эволюции молекулярно-генетических детерминант синтеза ферментов утилизации лактозы. Основанное только на изучении фенотипических и биохимических признаков дрожжей этого вида разделение на две группы, не дает четкого представления о происхождении групп, их эволюции. В связи с вышеизложенным, выполненные автором диссертационной работы Лютовой Людмилы Владимировны исследования имеют фундаментальное значение в области генетики, биологии и микологии, и прикладное значение для биотехнологии.

Поставленная автором **цель работы** – изучение молекулярного полиморфизма, таксономии и эволюции дрожжей *K. lactis* на материале штаммов различного экологического и географического происхождения представляется вполне обоснованной и соответствует современным актуальным направлениям генетики и микологии.

Для достижения этой цели диссертантом были поставлены следующие **задачи**:

1. Определение таксономического статуса дивергентных природных популяций в пределах вида *K. lactis* и подбор молекулярных маркеров для их достоверной дифференциации.
2. Молекулярный скрининг генов *LAC*, контролирующих ферментацию лактозы, и их хромосомное картирование у дрожжей разновидности *K. lactis* var. *lactis*.

3. Рекомбинационный анализ генов *LAC* различной хромосомной локализации у дрожжей *K. lactis var. lactis*.
4. Сравнительный анализ β -галактозидаз и пермеаз лактозы видов рода *Kluyveromyces*.
5. Изучение происхождения локусов *LAC* молочных дрожжей *K. lactis var. lactis*. Молекулярно-генетический анализ межвидовых гибридов *K. marxianus* \times *K. lactis*.
6. Использование межштаммовой гибридизации для создания новых штаммов молочных дрожжей *K. lactis*, способных активно сбраживать лактозу.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Обоснованность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций базируется на тщательной проработке теоретических основ изучаемой проблемы и анализе собственных экспериментальных данных, включающих статистическую обработку. Исследования проведены на большой выборке: с использованием 107 штаммов *Kluyveromyces* различного происхождения.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, значение полученных результатов для науки и практики

Диссертационная работа Лютовой Л.В. выполнена на высоком методическом уровне на современных приборах, с применением молекулярно-генетических, биотехнологических, компьютерных методов обработки и биоинформационных программ. В число используемых автором методов входили: ВЭЖХ анализ, метод Саузерн-гибридизации, полимеразная цепная реакция (ПЦР), AFPL - определение полиморфизма длины амплифицированных фрагментов, RFLP- определение полиморфизма длины фрагментов рестрикции и другие, что давало возможность получения достоверных данных для объективной дифференциации отдельных штаммов дрожжей.

Научная новизна исследований, выполненных Лютовой Л.В., заключается в том, что:

- впервые проведен филогенетический анализ β -галактозидаз и пермеаз видов рода *Kluyveromyces* и аминокислотных последовательностей этих ферментов у других родов дрожжей. Обнаружена корреляция между последовательностями генов *LAC* и экологическим происхождением штаммов *Kluyveromyces*.

- методом межвидовой гибридизации впервые продемонстрирована возможность переноса кластера лактозных генов *LAC4–LAC12* из молочного штамма *K. marxianus* в геном европейского природного Lac⁻ штамма *K. lactis* популяции «krassilnikovii».

- впервые установлено, что молекулярные кариотипы генетических популяций вида *K. lactis* имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести. Для достоверной идентификации и дифференциации внутривидовых популяций в пределах вида *K. lactis* автором рекомендовано использовать молекулярный маркер *ACT1*.

- доказан внутривидовой полиморфизм дрожжей *K. lactis* на материале штаммов, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира.

- установлено, что способность дрожжей *K. lactis* var. *lactis* ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV).

Значимость полученных результатов и выводов определяется тем, что в работе в качестве модельных организмов для исследований в генетике и молекулярной биологии использованы природные и коллекционные штаммы родов *Kluyveromyces*, а также видов *Scheffersomyces stipitis* и *Debaryomyces hansenii*. С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа впервые получены гибриды *K. lactis* var. *lactis* и молочных штаммов вида *K. marxianus*, обладающие наибольшей ферментационной активностью и представляющие интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных разработок. Создана коллекция

охарактеризованных молекулярными методами молочных и природных штаммов дрожжей *K. lactis*, которая может быть использована в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Выводы и положения, сделанные в диссертационной работе Лютовой Л.В., основаны на обширном экспериментальном материале, достоверны и обоснованы. Полученные результаты сравнивались с данными отечественных и зарубежных исследователей в сходном направлении.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа Лютовой Л.В. изложена на 153 страницах компьютерного текста и состоит из 7 разделов: введения, обзор литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, выводов, списка литературы. Работа содержит 35 рисунков, 10 таблиц. Список литературы включает 197 источников.

Материал диссертационной работы хорошо структурирован, изложен последовательно, логично, содержит информативные графики, диаграммы, иллюстрации и таблицы, которые аккуратно выполнены и иллюстрируют полученные результаты.

Во «Введении» автор кратко описывает актуальность темы исследования и степень ее разработанности, значимость выбора объекта для фундаментальных исследований. Автор обозначает существующую научную проблему, актуализирует тему исследования, обосновывает цель и основные направления ее реализации, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В разделе 1, главе 1 «Современная систематика дрожжей рода *Kluveromyces*» описана история классификации, основанная на морфологических и физиологических признаках, а далее таксономия дрожжей с использованием молекулярных методов. Представлен филогенетический анализ дрожжей *Kluveromyces*: наземные и морские виды.

Глава 2 «Система генов *LAC*» посвящена характеристике ферментов

β -галактозидаз и лактозному оперону. Рассмотрены процессы утилизации и ферментации лактозы различными видами дрожжевых грибов рода *Kluyveromyces*, а также внутривидовыми природными и молочными штаммами видов. Приводится описание генетических детерминант утилизации лактозы (ассимиляции и ферментации) у различных природных и адаптированных к биотехнологическим процессам изолятов.

В главе 3 «Материалы и методы» дано описание объектов и методов исследования. Приводится полная характеристика 107 штаммов, их происхождение, методы культивирования, состав питательных сред, методы оценки продуктов метаболизма культивируемых штаммов.

Отдельно дается описание молекулярно-генетических методов: физический мутагенез с использованием УФ-облучения, методы гибридизации с дальнейшей селекцией гибридов, полимеразная цепная реакция, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ анализ), секвенирование по методу Сенгера, анализ нуклеотидных последовательностей соответствующих генов и рибосомальных последовательностей в программе BLAST с использованием базы данных GenBank. Приводится описание метода молекулярного кариотипирования с выделением интактной хромосомной ДНК, пульс-электрофореза интактной хромосомной ДНК, метода Саузерн-гибридизации, филогенетического анализа изучаемых штаммов с использованием метода множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Используемые методы в работе автором Лютовой Л.В. показывают высокий уровень исследований и достоверность полученных результатов и выводов

Раздел «Результаты и обсуждения» включает три главы.

Одна из наиболее важных – глава 4, посвященная теме «Внутривидовой полиморфизм дрожжей *Kluyveromyces lactis*: генетические популяции», содержит разделы по изучению генетического внутривидового полиморфизма дрожжей *K. lactis*, молекулярному кариотипированию и гибридологическому

анализу. Большой объем экспериментальных исследований выполнен по определению внутривидового полиморфизма вида *K. lactis*: автор диссертационной работы использовала 67 штаммов, выделенных из различных объектов (молочных продуктов и природных источников различных регионов мира). Как показала автор в своих результатах ПДРФ-анализа межгенного спейсера IGS2 рДНК по сходству *AluI*-профилей, штаммы были разделены на восемь групп. При этом идентичные паттерны имели сбраживающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* с коллекционным штаммом *K. vanudenii* ВКМ Y-1535, объединенные в первую группу. Во вторую группу вошли европейские изоляты популяции «krassilnikovii» и среднеазиатские штаммы. Третья группа была сформирована штаммами популяции «восточная». Пять групп включают североамериканские штаммы: популяции «drosophilorum», «новая», «phaseolosporus», «pseudovanudenii» и «водная».

На основании исследований молекулярного кариотипирования автор показывает, что идентичные молекулярные кариотипы имеют молочные дрожжи var. *lactis* и европейские штаммы популяции «krassilnikovii», а также штаммы «drosophilorum» и «новая». Для штаммов *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 и UCM Y-1891, UCM Y-1892 (из Таджикистана) характерно наличие трех хромосомных полос в диапазоне 1000–1600 т.п.н., вместо двух как у штаммов var. *lactis* и европейских штаммов «krassilnikovii». Однако автор не объясняет полученный результат. На основании этих исследований автор приходит к заключению, что все изученные популяции *K. lactis* имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести. Для изучения полиморфизма дрожжей *Kluyveromyces lactis* проведен филогенетический анализ с использованием последовательностей ITS-участка, *EF-1 α* и *ACT1* генов, что позволило автору распределить все изученные штаммы *K. lactis* между 7 кластерами, имеющими $\geq 96\%$ бутстреп поддержки. При этом в первом кластере с 99%-ной статистической поддержкой оказались молочные штаммы var. *lactis* и Lac- штамм *K. vanudenii* ВКМ Y-1535, имеющие идентичные последовательности гена *EF-1 α* . При незначительных различиях (1–2

нуклеотидные замены) в гене *ACT1* и в ITS-участке (1-6), было подтверждено генетическое родство всех штаммов *K. lactis* var. *lactis*. Автор в работе доказывает, что все семь генетических популяций можно дифференцировать на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1*.

Особого внимания заслуживает следующий раздел результатов по гибридологическому анализу, проведенному с использованием высокофертильных моноспоровых культур гомоталлических штаммов и моноколониальных клонов гетероталлических дрожжей, у которых с помощью УФ-облучения были индуцированы различные ауксотрофные мутации. Как было доказано автором диссертационной работы, высокофертильными с выживаемостью аскоспор 84–97% и регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров оказались внутривидовые гибриды var. *lactis*. На основании этого раздела молекулярно-генетических исследований автор вполне доказательно обобщает, что комплексный вид *K. lactis* включает семь генетических популяций: var. *lactis*, «*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная», а генетические *Lac*-популяции дрожжей *K. lactis* имеют статус таксономических разновидностей.

В главе 5 «Молекулярный полиморфизм локусов *lac* дрожжей *Kluyveromyces*» представлены результаты изучения генов *LAC* у 33 сбраживающих лактозу штаммов *K. lactis* var. *lactis*, выделенных из молочных продуктов, почвы и клинических источников в различных регионах мира. Исследования проведены автором с использованием полифазного подхода (применения методов пульс-электрофореза, Саузерн-гибридизации и секвенирования). На основании полученных данных анализа хромосомного полиморфизма генов *LAC* автор делает заключение, что корреляции нет между происхождением штаммов и наличием определённых локусов *LAC*.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *LAC4* и *LAC12* дрожжей рода *Kluyveromyces* различной хромосомной локализации у 11 штаммов *K. lactis* var. *lactis*, выделенных из молочных продуктов, почвы и

в условиях госпиталя, а также у молочного штамма *K. marxianus* CBS 397, *LAC1*, *LAC2* и *LAC3* различались только 1–5 нуклеотидами. Автор показывает большое сходство нуклеотидных последовательностей генов *LAC4* дрожжей *var. lactis* и штаммов *K. marxianus* молочного происхождения, имеющих всего 1–3 нуклеотидные замены. С другой стороны, автор доказывает, что последовательности генов *LAC4* молочных и природных штаммов в пределах вида *K. marxianus* различались более 60 нуклеотидными заменами. Другой генетический детерминант – ген пермеазы лактозы *LAC12*, согласно исследованиям автора диссертации, имеет более вариабельные нуклеотидные последовательности. Различия между *LAC12*-последовательностями молочных штаммов *K. lactis var. lactis* и *K. marxianus* составили 1–14 нуклеотидов.

Далее на основании анализа аминокислотных последовательностей автором построено филогенетическое дерево, позволившее выявить степень сходства видов рода *Kluyveromyces*, которые объединены в отдельный кластер (бутстреп 100%), внутри которого выделяются два подкластера. Филогенетический анализ позволил автору диссертационной работы утверждать, что способность ферментировать лактозу у дрожжей *K. lactis var. lactis* контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хр. II) и *LAC3* (хр. IV). Большое сходство нуклеотидных последовательностей генов *LAC4/LAC12* молочных штаммов *K. lactis* и *K. marxianus* указывает на общее происхождение их *LAC* локусов.

В связи с этим, следующий раздел (глава 6 «Происхождение локусов *lac* молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis var. lactis*») содержит результаты анализа гибридов на генетическую идентификацию локуса *LAC3*. С помощью рекомбинационных тестов на аллелизм и Саузерн-гибридизации у дрожжей *K. lactis var. lactis* идентифицирован третий полимерный локус *LAC3*, расположенный на хромосоме IV.

На основании проведенных исследований автор высказывает гипотезу о том, что лактозные локусы *LAC* популяции дрожжей *K. lactis* var. *lactis*, приобрели от молочных штаммов *K. marxianus*. В результате проведения межвидовой гибридизации дрожжей были получены межвидовые гибриды между молочным штаммом *K. marxianus* CBS 397 и не утилизирующим лактозу штаммом *K. lactis* CBS 9058 популяция «krassilnikovii». Получены три сегреганта, имеющие гибридный *AluI*-профиль, в котором объединились фрагменты, характерные для *K. marxianus* и *K. lactis* популяции «krassilnikovii». Успешно проведенный эксперимент по межвидовой гибридизации, гибридологический анализ, молекулярное кариотипирование и рестрикционный анализ позволили автору подтвердить гипотезу о переносе лактозного кластера *LAC4–LAC12* из молочного штамма *K. marxianus* в геном природного Лас- штамма *K. lactis* из популяции «krassilnikovii», а не североамериканских дрожжей популяции «drosophilorum». Проведенный автором сравнительный анализ аминокислотных последовательностей другого фермента – дрожжевых и бактериальных β-галактозидаз *LAC4* и сравнение с их с имеющимися в литературе данными свидетельствуют о близком эволюционном родстве бактериальных и дрожжевых β-галактозидаз.

Последний раздел результатов (глава 7 «Межштаммовая гибридизация дрожжей *Kluuveromyces lactis* для создания штаммов, способных активно сбраживать лактозу», стр. 114-130) включает результаты изучения физиологической активности сбраживания лактозы и проведения гибридизации и отбора эффективных штаммов, интенсивно сбраживающих лактозу. В результате межштаммовой гибридизации активных штаммов автором получены 11 гибридов, среди которых наиболее перспективными рекомендовано 2 гибридных штамма. Автор делает заключение, что межштаммовая гибридизация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* – эффективный метод создания штаммов, способных активно сбраживать лактозу. Гибриды *K. lactis* var. *lactis* Н1-2, Н3-1 и штамм *K. marxianus* ВКМ У-1337, обладающие высокой ферментационной активностью, представляют

интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных работ с молочными дрожжами рода *Kluyveromyces*.

Раздел «Обсуждение», в которой автор детально проводит исторические причины эволюции дрожжевых грибов, выделяя первопричину генетической эволюции условия обитания, интерпретируя полученные результаты, высказывая свои предположения. Автор подтверждает правомерность выделения сбразивающих лактозу штаммов в отдельную разновидность *K. lactis* var. *lactis*, которая была предложена на основании физиологических и экологических критериев, к которым относят молочные дрожжи *Kluyveromyces*. Завершается диссертационное исследование «Выводами».

Автореферат изложен на 22 страницах, хорошо оформлен и полностью соответствует содержанию самой диссертации. Выводы в автореферате и диссертации идентичны.

Замечания и пожелания.

В тексте работы рассматриваемой диссертации необходимо указать на ряд замечаний и пожеланий:

1. При выравнивании аминокислотных последовательностей белков β -галактозидаз автор делает заключение о близком эволюционном родстве бактериальных и дрожжевых β -галактозидаз. Но на самом деле степень сходства недостаточно высокая.
2. В тексте автор не указывает нигде инициалы авторов, а просто указываются только фамилии, поэтому воспринимается как-то от автора «фамильярно».
3. Непонятно, как статистически оценивали бродильную активность у полученных гибридов? Линии на графиках (рис. 34) почти сливаются, явно по оценке критерия Стьюдента различия будут недостоверны между гибридами и родительскими штаммами.

Высказанные замечания не снижают общей высокой оценки работы, не умаляют значимости полученных результатов и не меняют основные выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации. Диссертация,

выполненная Лютовой Людмилой Владимировной, отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.18. – Микология (биологические науки) и 1.5.7. – Генетика (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лютова Людмила Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.18. – Микология и 1.5.7. – Генетика.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

профессор

кафедры ХимБиотех

факультета химической технологии и биотехнологии

ФГБАОУ ВО «Московский политехнический

университет»

Громовых Татьяна Ильинична _____

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.24 - Микология (биол. науки)

Адрес места работы:

107023, Москва, ул. Автозаводская, 16

Федеральное государственное бюджетное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский политехнический университет» факультет

химической технологии и биотехнологии, кафедра ХимБиотех

Тел.: _____

Подпись доктора биологических наук Громовых Т.И. удостоверяю:

13 апреля 2024