

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **Старикова Александра Юрьевича «Изучение субстратной специфичности десатураз жирных кислот цианобактерий»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений

Исследование синтеза жирных кислот имеет важное фундаментальное и прикладное значение. С 70-х годов прошлого века началось интенсивное изучение профилей жирных кислот различных таксонов (от бактерий до позвоночных), результатом которого стало обнаружение таксонспецифичности состава жирных кислот. Причины таксонспецифичности изучаются по сегодняшний день. Это направление исследований послужило основой использования жирных кислот в качестве маркеров трофических взаимодействий в различных экосистемах. Параллельно исследовалось значение отдельных жирных кислот в метаболизме живых существ. Часть работ направлена на изучение влияния жирных кислот на здоровье животных, в первую очередь человека, а часть – на возможность модификации жирнокислотного состава организмов, в основном бактерий и растений, с целью получения биомассы с заданным биохимическим составом. Данные работы базируются на знании принципов синтеза жирных кислот у разных таксономических групп организмов. Синтез жирных кислот осуществляется посредством работы ферментов, которые и определяют набор синтезируемых жирных кислот. Десатуразы являются ключевыми ферментами, разнообразие которых и принцип взаимодействия с молекулами до сих пор малоизучены. Поэтому диссертационная работа Александра Юрьевича, посвященная изучению специфичности $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - и $\Delta 6$ -десатураз жирных кислот в отношении длины цепи жирных кислот и способа «отсчета» при образовании двойной связи, актуальна. Она успешно решает задачи исследования, а именно: получение трансформантов *Synechococcus elongatus* PCC 7942, экспрессирующих гены *glr2623* ($\Delta 12$), *slr1350* ($\Delta 12$), *slI0262* ($\Delta 6$) и *desC1200* ($\Delta 9$) ДЖК, а также ацилтрансферазы *plsC1200*; исследование влияния конститутивной экспрессии данных генов на состав ЖК трансформантов; культивирование полученных трансформантов в присутствии нетипичных ЖК (вакценовой и гептадеценовой) и подтверждение их включения в липидный метаболизм клеток; и подтверждение положения двойных связей в синтезирующихся диеновых ЖК из экзогенных вакценовой и гептадеценовой кислот.

Во Введении диссертации обоснована актуальность исследования в связи со степенью разработанности темы, сформулированы его цель и задачи и выносимые на защиту положения, охарактеризованы научная новизна, теоретическое и практическое значение работы, а также

декларированы степень достоверности результатов, апробация, личный вклад автора и публикации.

Глава 1 представляет собой обзор изученности десатураз у бактерий и некоторых фотосинтезирующих прокариот и эукариот, и перспектив биотехнологического использования микроводорослей и, в частности, цианобактерий.

Глава 2 раскрывает методические особенности выполненной работы, протоколы, материалы и методы исследования, которые включали культивирования цианобактерий, молекулярно-генетический анализ (выделение ДНК и РНК, клонирование генов, ПЦР, рестрикция, лигирование, получение трансформантов и т.д.) и биохимический анализ (экстракция липидов, дериватизация жирных кислот, тонкослойная, газовая и высокоэффективная жидкостная хроматографии, масс-спектрометрический анализ).

В главе 3 представлены результаты экспериментальных исследований и их обсуждение. Подробно описана логика проведенных экспериментов, результаты которых не вызывают сомнений. В первой части главы 3 приведены результаты, доказывающие, что изученные в работе $\Delta 12$ -десатуразы (кодируемые генами *glr2623*, *slr1350*) встраивают новую двойную связь, «отсчитывая» три атома углерода от имеющейся двойной связи, независимо от длины ацил-липидных молекул. Основные итоги данной главы отражены в выносимом на защиту положении № 1. Во второй части главы 3 приведены эксперименты с трансформантами, наглядно демонстрирующие особенности взаимодействия $\Delta 6$ -десатуразы (кодируемая геном *sl10262*) с жирными кислотами. Полученным в этой главе выводам соответствует выносимое на защиту положение № 2. Результаты этой части исследования имеют важное фундаментальное значение. В третьей части главы 3 представлены результаты экспериментов с коэкспрессией двух генов ацилтрансферазы *plsC1200* и десатуразы *desC1200*, демонстрирующие условия, при которых можно получить биомассу цианобактерий с большим количеством короткоцепочечных насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, что имеет большое прикладное значение в биотехнологии при создании штаммов-продуцентов биодизеля. Основной результат этой главы отражен в выносимом на защиту положении № 3.

Вопросы к работе:

1. В первом положении, выносимом на защиту указано, что $\Delta 12$ -десатуразы отвечают за формирование диеновых кислот. Однако, возникает вопрос, способны ли эти десатуразы формировать триеновые кислоты, например после работы $\Delta 9$ - и $\Delta 6$ -десатураз?
2. Стр.5 «Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), такие как α - и γ -линоленовая (18:3), стеаридоновая (18:4) кислоты важны для поддержания здоровья человека». Какова роль данных ПНЖК в здоровье человека?

3. Стр.14 «Для бактерий основная длина цепи составляет 16 или 18 атомов углерода». Для всех ли групп бактерий это утверждение верно?
4. Стр.30-31 В отличие от цианобактерий другие водоросли содержат «набор десатураз достаточный для биосинтеза большинства существующих в природе ЖК». Синтез жирных кислот – это энергетически затратный процесс. Вероятно, такое разнообразие жирных кислот у водорослей должно давать им некие преимущества. Каковы Ваши предположения о причинах формирования такого разнообразия жирных кислот у водорослей и какие преимущества они могут дать?
5. Стр.42 «А отсутствие прочной клеточной стенки, имеющейся у многих микроводорослей, снижает возможный урон пищеварительной системе рыб (Atalah et al., 2007)». Можно ли считать цианобактерии ценным компонентом питания рыб?

Замечания к сути работы отсутствуют, однако к представлению материала, его изложению и оформлению имеются следующие замечания:

1. В тексте имеются большое количество опечаток, в том числе связанных с автозаменой, несогласованные окончания слов, некорректное использование предлогов, описки и ошибки в пунктуации.
2. Ссылки на таблицы и рисунки зачастую приводятся после самих таблиц и рисунков или вовсе отсутствуют.
3. Формулы жирных кислот зачастую написаны не полностью и с ошибками, или приведены неточные названия жирных кислот. Примеры: стр.16 «олеиновой (**C18Δ9**) кислот»; стр.20 «(**C16** в результате работы «прокариотического пути» синтеза ЖК обычно находится в положении *sn*-2)»; стр. 30 «возрастало общее количество **линоленовой кислоты**» - *n*-3 или *n*-6?; стр. 42 «и докозагексаеновая (**C22:5n3**), чьё...»

Изложенные замечания оставляют ощущение спешки и небрежности автора при написании диссертационной работы. Однако, приведенные замечания не умаляют достоинств диссертационной работы, являющейся оригинальной, завершённой научно-квалификационной работой, в которой установлены механизмы работы нескольких ферментов десатураз в цианобактериях. Ее достоверность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость не вызывают сомнения. Текст автореферата соответствует содержанию диссертации.

Диссертационная работа А. Ю. Старикова «Изучение субстратной специфичности десатураз жирных кислот цианобактерий» полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени

кандидата наук. Автор диссертации, А. Ю. Старикова, заслуживает присуждения ему степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Доктор биологических наук (специальность 03.02.10 – Гидробиология),
Институт биофизики Сибирского отделения
Российской академии наук (ИБФ СО РАН) – обособленное подразделение
ФГБНУ Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН),
лаборатория экспериментальной гидроэкологии,
ведущий научный сотрудник

Олеся Николаевна Кормилец

660036 г. Красноярск, Академгородок, 50/50, «ИБФ СО РАН»,
телефон: (391)243-15-79, моб. +79059730709, факс: (391)290-54-90
электронная почта: makhutova@ibp.krasn.ru

25.04.2023

