

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Александра Глебовича БУЛАХОВА  
«Свойства литических полисахаридмонооксигеназ из низших грибов»,  
представленной на соискание ученой степени  
кандидата химических наук по специальностям  
03.01.04 Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Полисахаридмонооксигеназы (ПМО) новый класс ферментов, который последние 7 лет всесторонне исследуется во многих лабораториях мира. Изучение этого класса ферментов представляет как научный, так и, в первую очередь, практический интерес, поскольку ПМО можно использовать в составе целлюлазных комплексов для биоконверсии целлюлозосодержащих отходов различных отраслей промышленности. Применение ПМО существенно увеличивает эффективность процесса осахаривания биомассы в процессах биотехнологического получения биотоплив и ряда других полезных продуктов. В этой связи работа Булахова А.Г., посвящённая изучению биохимических и физико-химических характеристик полисахаридмонооксигеназ и конструированию новых ферментных комплексов для осахаривания целлюлозосодержащей биомассы, является, несомненно, актуальным исследованием.

На первых этапах выполнения работы соискателем с применением хроматографических методов были выделены очищенные препараты двух рекомбинантных и одной нативной полисахаридмонооксигеназы из 3-х видов аскомицетов. Все дальнейшие исследования, связанные с изучением физико-химических свойств и определением ферментативных активностей проводились на этих трёх типах ПМО. Для исследования каталитических свойств этих ферментов диссертантом был разработан оригинальный метод детекции активности ПМО, основанный на измерении потребления кислорода в процессе ферментативной реакции с помощью флуоресцентных сенсоров на кислород. Данный метод, в отличие от хроматографических методик, используемых в литературе, позволяет в режиме начальных скоростей реакции определять кинетические характеристики ПМО, а также в режиме реального времени оценивать влияние различных эффекторов на активность фермента. С помощью разработанного метода соискатель определил активности исследуемых ПМО, измерил рН-профили их активностей, исследовал субстратную специфичность энзимов, дозозависимость скоростей реакции и проследил за влиянием процесса инактивации и реактивации ферментов в режиме реального времени. Помимо этого методом дифференциальной сканирующей калориметрии им была определена температурная стабильность как активных, так и инактивированных форм исследуемых ПМО.

Несомненный интерес представляют и работы соискателя, направленные на получение генно-инженерными методами штамма гриба *Penicillium verruculosum*, экспрессирующего гетерологичный ген ПМО *Trichoderma reesei* под контролем индуцибельного промотора гена глюкоамилазы. Полученный рекомбинантный штамм продуцировал комплекс целлюлазных ферментов (hLPMO), включая ПМО *T. reesei*,

который в процессе гидролиза измельчённой осиновой древесины обеспечивал существенное увеличение выхода глюкозы по сравнению с таковым в случае гидролиза, осуществляемого целлюлазным комплексом, продуцируемым исходным штаммом *P. verruculosum* B1-537. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия гена ПМО *T. reesei* рекомбинантным штаммом *P. verruculosum* не повлияла сколь-либо существенно на баланс комплекса целлюлаз, но напротив, значительно увеличила эффективность процесса осахаривания осиновых опилок за счёт участия в гидролитическом процессе ПМО *T. reesei*. Кроме того, соискателем предложен оригинальный способ значительного усиления осахаривания осиновой древесины с помощью применения смеси двух типов ферментных препаратов: hLPMO и аналогичного препарата hBGL2, содержащего рекомбинантную  $\beta$ -глюкозидазу. Применение смеси этих ферментных препаратов привело к получению высокого выхода сахаров, составляющего 58 г/л, т.е. близкого теоретически возможному.

Важным разделом диссертации являются исследование, направленное на создание рекомбинантного штамма *P. verruculosum*, продуцирующего химерный полипептид, содержащий в N-концевой области аминокислотную последовательность ПМО *T. terrestris*, а в C-концевой области последовательность пептидного линкера с целлюлозосвязывающим доменом целлюбиогидролазы I *P. verruculosum*. Рекомбинантный химерный фермент обладал расширенной субстратной специфичностью по сравнению с нативной формой ПМО. Применение мутантной ПМО в сравнении с исходной в составе целлюлазного комплекса позволило увеличить эффективность осахаривания осиновой древесины на 20% и сократить общее время гидролиза.

Всё выше изложенное позволяет сделать заключение, что диссертационная работа А.Г. Булахова является законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное достижение в области исследования ферментативной активности полисахаридмонооксигеназ и создания штаммов низших грибов, продуцирующих наряду с комплексом целлюлолитических ферментов и рекомбинантные полисахаридмонооксигеназы из различных видов грибов.

Автореферат дает полное представление о диссертационной работе. В целом А.Г. Булаховым успешно выполнена объёмная экспериментальная работа, имеющая большое теоретическое и практическое значение. Поставленные в диссертационной работе задачи выполнены в полном объёме с использованием современных молекулярно-биологических и генно-инженерных методов исследования. Полученные соискателем результаты являются оригинальными и достоверными. Принципиальных замечаний по существу работы и оформлению автореферата нет. Тем не менее, следует отметить ряд замечаний по оформлению автореферата:

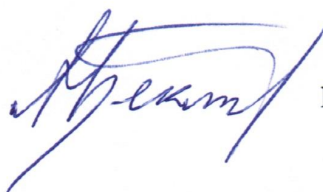
1. В тексте встречаются стилистические ошибки. Это касается формулировок цели и некоторых пунктов задач работы, а также отдельных пунктов научной новизны и положений, выносимых на защиту.

2. В тексте используются не корректно некоторые термины, например: «экспрессия ПМО ... » правильно писать «экспрессия гена ПМО ... »; «штамм-продуцент *P.verruculosum*, секретирующий ....» правильно писать «штамм *P.verruculosum* – продуцент ПМО, секретирующей ...»; «клонирован в лабораторный вектор...» правильно писать «клонирован в составе вектора ... в клетках *E. coli* или гриба»; «трансформация плазмиды в реципиентный штамм ... » правильно писать «реципиентный штамм трансформирован плазмидой ....»;

Разумеется, сделанные замечания не затрагивают существа интересной, и, на мой взгляд, очень важной, как с научной, так и с практической точек зрения работы диссертанта.

Диссертационная работа по актуальности изучаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях, соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям п. 7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ №74 от 30.01.2002 г.) с «Изменениями» (постановление Правительства РФ №475 от 20.06.2011 г.), а ее автор Булахова Александр Глебович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Главный научный сотрудник  
ФГБНУ «Федеральный исследовательский  
центр фундаментальной и трансляционной  
медицины», д.б.н., проф.



Беклемишев А.Б.

Личную подпись *Беклемишева А.Б.*  
**Заверяю**  
Начальник отдела кадров *Мелев А.И.*  
*30 мая 2018 г.*

