

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

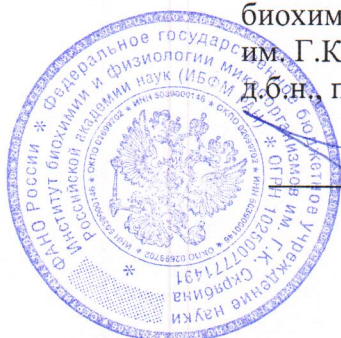
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

142290, Московская обл., г. Пушкино, просп. Науки, д. 5
Тел./факс: (495) 956-33-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru, <http://www.ibpm.ru>
ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОГРН 1025007771491, ОКПО 02699702, ОКВЭД 73.10, ОКОПФ 75103
Отдел №34 УФК по Московской области (ИБФМ РАН лицевого счет 20486Ц87560)
Р/с 40501810545252000104 ГУ Банка России по ЦФО БИК 044525000

№ _____
На № _____ от _____

“УТВЕРЖДАЮ”

ВРИО директора ФГБУН «Институт
биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина РАН»,
д.б.н., проф.



_____ А.А. Леонтьевский

«24» апреля 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Булахова Александр Глебовича «Свойства литических полисахаридмонооксигеназ из низших грибов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Булахова А.Г. посвящена исследованию свойств нового семейства ферментов, полисахаридмонооксигеназ (ПМО), принимающих участие в процессах биохимической деструкции целлюлозосодержащей биомассы. До недавнего времени считалось, что основными компонентами ферментных комплексов, продуцируемых различными микроорганизмами и осуществляющих биодеструкцию полисахаридов клеточной стенки растений, являются гидролитические ферменты, относящиеся к классу карбогидраз. Однако несколько лет назад (в 2010-2011 гг.) были открыты ферменты, катализирующие окислительный разрыв полимерной цепи целлюлозы и других полисахаридов – литические ПМО, которые также принимают участие в биодеструкции растительной биомассы.

Ферментативный гидролиз возобновляемого целлюлозосодержащего сырья является наиболее дорогостоящей и трудоемкой стадией процессов переработки растительной биомассы в такие полезные продукты, как спирты, amino- и органические кислоты, бутadiен и др. Таким образом, снижение себестоимости процесса за счет увеличения эффективности действия ферментных препаратов является важной и актуальной задачей современной биотехнологии. Одной из задач диссертационной работы Булахова А.Г. была разработка нового рекомбинантного штамма мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, продуцирующего комплекс целлюлолитических ферментов с усиленной осаживающей способностью за счет экспрессии грибом гетерологичной ПМО. Наряду с получением новых фундаментальных знаний о биохимических закономерностях действия ПМО из аскомицетов *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* и *Myceliophthora thermophila*, это направление работы диссертанта обуславливает актуальность исследования.

Как было указано выше, ПМО были открыты совсем недавно, что вызвало огромный интерес в научном сообществе к данному объекту исследования и свидетельствует о научной новизне диссертационной работы. Важно отметить, что до последнего времени не существовало метода определения активности ПМО в режиме начальных скоростей реакции, и литературные данные о биохимических свойствах и кинетических параметрах действия ферментов этого класса были крайне скудны. Кроме того, закономерности взаимодействия ПМО с индивидуальными ферментами – компонентами целлюлазного комплекса (целлобиогидролазами и эндоглюканазами) также были исследованы недостаточно. В ходе исследования Булаховым А.Г. был разработан метод определения активности ПМО по скорости потребления кислорода в реакционной смеси в ходе реакции с помощью высокочувствительных сенсоров на кислород. Данный метод позволил не только определить кинетические параметры действия ПМО из трех видов низших грибов, но и получить данные по субстратной специфичности, pH-зависимостям активности исследуемых ферментов, а также изучить в режиме реального времени влияние эффекторов (ЭДТА и ионов Cu^{2+}) на активность ПМО. В ходе работы Булаховым А.Г. были исследованы аспекты синергетического взаимодействия ПМО с отдельными представителями целлюлаз и с целлюлазным комплексом в целом. Впервые была проведена работа по белковой инженерии ПМО с целью улучшения важных для катализа характеристик фермента. Полученный химерный фермент, состоящий из двух доменов – ПМО *T. terrestris* и целлюлозосвязывающего модуля целлобиогидролазы I *P. verruculosum*, связанных

через пептидный линкер, характеризовался не только повышенной адсорбционной способностью на целлюлозе, но и обладал расширенной субстратной специфичностью и более высокой удельной активностью по отношению к целлюлозе и ксилоглюкану, что позволило повысить эффективность комплексного гидролиза целлюлозосодержащих субстратов за счет добавки химерной ПМО к целлюлазному препарату. Наконец, в рамках диссертационной работы был получен новый мутантный штамм гриба *P. verruculosum*, экспрессирующий под контролем промотора гена глюкоамилазы рекомбинантную ПМО *T. reesei* при сохранении в целом базового целлюлазного комплекса, что позволило улучшить осаживающую способность соответствующего ферментного препарата.

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы и приложение (благодарности). Библиографический указатель содержит 141 источник литературы и включает современные публикации отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 144 страницах, включает 49 рисунков и 7 таблиц.

Во «Введении» обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы, указана научная и практическая значимость полученных результатов.

Сведения, приведенные в разделе «Обзор литературы», соответствуют современному состоянию вопроса. Обзор литературы включает в себя описание структуры клеточной стенки растений и основных свойств целлюлозосодержащего сырья, общего механизма его ферментативной деградации; в разделе рассмотрены вопросы классификации ферментов, участвующих в ферментативной деструкции целлюлозы, включая ПМО, обсуждается структура и возможный механизм действия ПМО, а также их свойства и особенности методов исследования катализируемых ПМО ферментативных реакций. Материал разбит на три главы, изложен в строгой логической последовательности и иллюстрирован рисунками.

В разделе «Материалы и методы» приведены сведения об использованных в работе материалах и детально описаны методы исследования. Грамотное использование в работе современных физико-химических, биохимических и молекулярно-биологических методов позволяет считать, что полученные результаты являются объективными, достоверными и не вызывающими сомнений.

В разделе «Результаты и их обсуждение» представлены оригинальные экспериментальные результаты и их обсуждение. Данный раздел состоит из семи частей.

В первой части (глава 5) описаны способы и результаты выделения рекомбинантных ПМО из грибов *T. terrestris* и *T. reesei*, нативной ПМО из *M. thermophila*, а также целлобиозодегидрогеназы (ЦДГ) *M. thermophila*, использованной в качестве вспомогательного фермента в исследовании. Методом электрофореза в полиакриламидном геле показана гомогенность выделенных ферментов. Грамотно проведена идентификация белков методом МАЛДИ масс-спектрометрии.

Вторая часть раздела «Результаты и их обсуждение» (глава 6) посвящена разработке метода определения активности ПМО по скорости потребления кислорода. Данный показатель удалось зафиксировать с помощью прибора Seahorse XFp компании Agilent (США), который предназначен для мониторинга концентрации растворенного кислорода в жидкой среде в ходе жизнедеятельности микроорганизмов. Булаховым А.Г. была продемонстрирована возможность использования прибора и для измерения кинетики ферментативных реакций с участием кислорода. Помимо подробного описания разработанного метода, в данной главе описываются возможности прибора для мониторинга активности ПМО и влияния эффекторов в режиме реального времени, в частности, было продемонстрировано ингибирование фермента хелатирующим агентом (ЭДТА), который извлекал ионы меди из активного центра ПМО, и последующая реактивация фермента после введения в раствор избытка сульфата меди.

В следующей части (глава 7) представлены характеристики ферментов, которые были определены с помощью вышеописанного метода, а именно: влияние рН на активность исследуемых ПМО, их специфичность по отношению к различным полисахаридным субстратам, влияние различных химических соединений – восстановителей, являющихся потенциальными донорами электронов для ПМО, на скорость потребления кислорода в реакционной смеси при использовании в качестве субстрата аморфизованной целлюлозы. В этой же главе представлены данные по температурной стабильности исследуемых ПМО, определенной методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Важно отметить, что диссертантом также были получены данные по термостабильности и инактивированных ПМО, в которых путем обработки ЭДТА из активного центра был удален атом меди. Изучение особенностей температурной денатурации активных и инактивированных форм

фермента является важным моментом с точки зрения получения информации о влиянии структурной организации ПМО на их стабильность.

В главе 8 представлены результаты анализа продуктов деструкции целлюлозы исследуемыми ПМО и их обсуждение. Используя высокоэффективную анионообменную жидкостную хроматографию (НРАЕС), диссертантом были идентифицированы окисленные формы олигосахаридов – продукты действия ПМО из *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila* на целлюлозу, что позволило выявить преимущественные сайты окисления глюкозидных остатков в полимере в ходе ферментативной реакции. Результаты хроматографического анализа были подтверждены методом МАЛДИ масс-спектрометрии.

В следующей части работы (глава 9) представлены данные по исследованию взаимодействия ПМО с индивидуальными целлюлазами – целлобиогидролазами (I и II) и эндоглюканазами (I и II), относящимся к различным семействам гликозидгидролаз. Установлены эффекты синергизма между исследуемыми ПМО и указанными целлюлазами. Стоит отметить обнаруженную А.Г.Булаховым корреляцию между полученными данными о преимущественном сайте окисления целлюлозы каждой из изучаемых ПМО и масштабу синергизма при ее взаимодействии с целлобиогидролазами I и II. В этой же главе исследовано влияние ПМО из *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila* на деструкцию целлюлозных субстратов под действием композиционного ферментного препарата *P. verruculosum*. В ходе работы диссертанту удалось систематизировать данные о влиянии доноров электронов различной природы на эффективность деструкции целлюлозы ферментными смесями, что представляет несомненную практическую ценность при разработке ферментативных процессов биоконверсии целлюлозосодержащего сырья.

В десятой главе диссертационной работы описано получение методом генетической инженерии нового грибного рекомбинантного штамма – продуцента ферментного комплекса для деструкции целлюлозосодержащих материалов. В геном штамма-реципиента на основе *P. verruculosum* был введен ген ПМО *T. reesei* под контролем промотора гена глюкоамилазы (*glal*), что позволило сохранить целостность исходного целлюлазного комплекса гриба и получить экспрессию гетерологичной ПМО в количестве достаточном для синергетического эффекта с целлюлазами. Полученный ферментный препарат hLPMO обладал повышенной осаживающей способностью по отношению к лигноцеллюлозному субстрату, в качестве которого была использована предобработанная осиновая древесина. Примечательно, что смешав

в равных пропорциях по белку препарат hLPMO с аналогичным препаратом hBGL2, содержащим гетерологичную бета-глюкозидазу *A. niger*, автору диссертационной работы удалось создать высокоактивный композиционный ферментный комплекс, который оказался вдвое эффективнее контрольного препарата, полученного на основе исходного штамма-реципиента *P. verruculosum*.

В заключительной части раздела «Результаты и их обсуждение» (глава 11) описано получение химерного белка (ПМО-ЦСМ) на основе ПМО *T. terrestris*, к С-концу которой через пептидный линкер был присоединен целлюлозосвязывающий модуль целлобиогидролазы I *P. verruculosum*, его экспрессия, выделение и очистка, а также свойства в сравнении с исходной ПМО. Полученный химерный фермент, помимо повышенной адсорбционной способности на целлюлозе, обладал расширенной субстратной специфичностью. Химерный ПМО-ЦСМ приобрел способность расщеплять ксилан и карбоксиметилцеллюлозу, его активность по отношению к целлюлозе возросла на 24%, а по отношению к ксилоглюкану – почти на порядок. Подобное улучшение каталитических характеристик не могло не сказаться и на комплексной деструкции целлюлозосодержащего сырья. Так, применяя химерный фермент в качестве добавки в высокоэффективному целлюлазному препарату hBGL2 на основе *P. verruculosum*, удалось сократить время полного гидролиза осиновой древесины до 24 часов, при этом выход сахаров оказался существенно выше, чем при использовании в качестве добавки исходной ПМО *T. terrestris*, а также ПМО *T. reesei*, исходно содержащей в структуре собственный целлюлозосвязывающий модуль.

Диссертация хорошо оформлена, понятно и грамотно написана, и в целом работа выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровне с использованием современных методов исследования. Результаты диссертации несомненно обладают большой научной новизной и практической значимостью. Выводы диссертации хорошо обоснованы и непосредственно следуют из представленных экспериментальных данных. Данная работа вносит существенный вклад в область исследования нового класса металлозависимых ферментов – литических полисахаридмонооксигеназ, осуществляющих окислительную деструкцию природных полисахаридов, и в область биохимии ферментативной деструкции лигноцеллюлозных материалов в целом. К работе имеются следующие замечания:

- 1) В материалах и методах исследования не прописана методика хроматографического фракционирования препарата hLPMO с целью оценки количественного содержания рекомбинантной ПМО.

2) В работе не представлены данные о термостабильности химерного фермента, которые показали бы, какое влияние на стабильность белка оказывает присоединение целлюлозосвязывающего модуля.

Сделанные замечания не являются существенными и никоим образом не влияют на достоверность и надежность полученных результатов, а также на выводы диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы докладывались на международных и всероссийских научных конференциях, опубликованы в ведущих российских и зарубежных журналах, входящих в Перечень, рекомендованный ВАК РФ.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Полученные автором результаты могут быть использованы в лабораториях, работающих в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии. Диссертационная работа Булахова А.Г. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым ВАК согласно пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в редакции № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г.), а ее автор безусловно заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Работа была заслушана и обсуждена, отзыв на диссертацию также был обсужден и одобрен на семинаре лаборатории микробной энзимологии ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН» («18» апреля 2018г., протокол № 2/2018)

Зав. лабораторией, д.б.н.

И.Г. Моргунов

142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 5
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина

Российской академии наук (ИБФМ РАН)

Тел./факс: +7 (495) 956-33-70; 8 (4967) 73-39-62

Электронная почта: rta@ibpm.pushchino.ru

Сайт: www.ibpm.ru

