

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Булахова Александра Глебовича «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).

Диссертационная работа Булахова Александра Глебовича посвящена углублению понимания процессов ферментативной деструкции целлюлозосодержащего сырья (ЦСС), и повышению эффективности этих процессов для конвертации ЦСС в продукты, полезные для биотехнологии. С этими целями изучены свойства трёх полисахаридмонооксигеназ (ПМО) из *Trichoderma reesei*, *Thielavia terrestris*, и *Myceliophthora thermophila*, их роль в деструкции ЦСС комплексом ферментов низших грибов, получены штаммы *Penicillium verruculosum*, экспрессирующие ПМО из *Trichoderma reesei*, путём белковой инженерии усовершенствована ПМО из *Thielavia terrestris*, и изучены её свойства.

**Актуальность темы диссертации**

Значительная часть энергии, используемой человечеством, имеет Солнечное происхождение. Это, в первую очередь, ископаемые энергоносители (нефть, уголь, природный газ), которые вовлечены в генерацию электроэнергии, тепла, в производство топлива. Во вторую очередь, это растительная биомасса, традиционно используемая для генерации тепла в малых хозяйствах – дрова, торф, пеллеты. В то же время, сегодня растительная биомасса всё активнее используется для производства топлива – биоэтанола, биодизелей.

В результате всего лишь векового использования ископаемых энергоносителей для энергетики стала хорошо видна перспектива исчерпания их запасов. Таким образом, Солнечная энергия, запасённая в ископаемых энергоносителях, неуклонно заканчивается, в то время как она продолжает запасаться в современной растительной биомассе. С другой стороны, ископаемые энергоносители являются ценнейшим сырьём для химического синтеза, и их сжигание подобно топке печей ассигнациями. В то же время запасы растительной биомассы сравнимы с запасами ископаемых энергоносителей, и, что особенно важно, восполняемы. Кроме «живой» биомассы, потенциальный источник растительного сырья - большое количество отходов от переработки растений, производящихся в деревообрабатывающей промышленности, сельском хозяйстве. Так же как и нефть с газом, растительная биомасса может служить и сырьём для энергетики, и сырьём для химического синтеза.



Для крупномасштабного вовлечения растительной биомассы в энергетику и химический синтез необходимы эффективные способы её конверсии в доступное сырьё, в том числе в сахара, органические кислоты, и др. Таким эффективным способом может стать ферментативный гидролиз, который, благодаря мягким условиям процесса, позволяет получать простые органические вещества, пригодные для дальнейшей химической, и, что особенно ценно, микробиологической трансформации. Наиболее труден гидролиз целлюлозы, составляющей большую часть растительных остатков, в связи с чем использование целлюлолитических ферментных комплексов, и их дальнейшее усовершенствование имеет важное значение для переработки растительного сырья.

Гидролиз ЦСС в природе осуществляется, в том числе, комплексом карбогидраз низших грибов (например, целлобиогидролаз, эндоглюканаз,  $\beta$ -глюкозидаз), из которых сегодня известны не все ферменты. Открытые недавно дополнительные участники гидролиза ЦСС - полисахаридмонооксигеназы низших грибов – обладают другим механизмом воздействия на целлюлозу, и могут вносить существенный синергетический вклад в её гидролиз. Современные представления о свойствах полисахаридмонооксигеназ весьма неполны, что не позволяет полноценно разрабатывать более совершенные формы ферментных препаратов для гидролиза ЦСС.

Таким образом, тема диссертации является актуальной как для решения фундаментальных задач (изучение механизмов работы ферментов), так и для прикладных исследований (усовершенствование биотехнологий конверсии целлюлозы).

### *Содержание диссертации*

Диссертационная работа Булахова А.Г. построена по традиционному плану, изложена на 144 страницах, состоит из Введения, Обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, Заключение, выводов, списка цитированной литературы, включающего 141 источник. В целом диссертация носит завершённый характер, хорошо проиллюстрирована (содержит 49 рисунков).

Во **Введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи исследования, подчёркнута научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту, даны сведения о личном вкладе диссертанта, степени достоверности результатов, апробации и публикации работы, связи работы с государственными программами.

В главе **Обзор литературы** автор подробно рассматривает количество и характеристики ЦСС, образующегося на территории Российской Федерации, и подчёркивает перспективность использования такого сырья для нашей страны. Освещены литературные данные о составе клеточной стенки растений и связанных с этим составах различных видов ЦСС, современные представления о ферментативной деструкции растительной биомассы.



Подробно изложены имеющиеся сведения о структурах, механизме действия, активности и субстратной специфичности известных полисахаридмонооксигеназ, и о взаимодействии этих ферментов с другими грибными ферментами, участвующими в деструкции ЦСС. Обзор литературы свидетельствует о том, что автор хорошо ориентируется в проблеме, проанализировал большое количество современной научно-технической информации, способен на критический анализ и обобщения.

В главе **Материалы и методы** содержится детальное описание всех методик, использованных в диссертации, что позволяет оценить достоверность результатов, и воспроизвести эти методики другим исследователям. В качестве замечаний можно отметить следующие моменты.

В разделах 4.11.1, 4.11.2, 4.11.4, связанных с определением активности фермента полисахаридмонооксигеназы, не приведены единицы, в которых измеряется эта активность. Указано лишь, что на основании скорости потребления кислорода рассчитывали скорость ферментативной реакции. В то же время, в научной литературе принято выражать активность ферментов в количестве продукта/субстрата, полученного/преобразованного за единицу времени, и отнесенного к количеству фермента.

Указано, что для запуска ферментативной реакции в растворе создавали определённую концентрацию фермента ПМО, но не указано, в каких единицах измеряли эту концентрацию. Хотя из раздела «Результаты и их обсуждение» и можно понять, что она измерялась в микромолях, в разделе «Материалы и методы» нет явного указания на то, как определяли молярную концентрацию фермента в концентратах, из которых фермент ПМО добавлялся в реакцию.

Глава **Результаты и их обсуждение** содержит подробное и хорошо иллюстрированное изложение хода работ, полученных результатов, и оценки достоверности и значимости результатов. В качестве замечаний к Результатам можно отметить следующие моменты.

Раздел 6.1 (Активность ПМО по скорости потребления кислорода) недостаточно полно объясняет особенности разработанной автором методики и возможности её применения для оценки числа оборотов ПМО.

Как следует из рис. 19, в ходе инкубации фермента с субстратом и периодических измерений скорости потребления кислорода, абсолютное содержание  $O_2$  в растворе снижается. Кислород является одним из субстратов фермента, и его концентрация может влиять на определяемое значение активности фермента. В целом, уровни активности ферментов принято измерять в условиях избытка субстрата (субстратов), для того чтобы избежать влияния степени сродства фермента к субстратам на результаты. Автор не поясняет, проводилась ли им работа по выяснению влияния абсолютного содержания  $O_2$  в растворе на уровень активности фермента. В обзоре литературы также нет явного указания на



проведённые ранее исследования на эту тему. Кроме того, снижение абсолютного содержания  $O_2$  в растворе может указывать на недоработанность методики, т.к. в ходе цикла перемешивания (1 мин) и уравнивания (5 мин) не происходит восстановления содержания кислорода к его уровню перед началом цикла.

Как указывалось выше, активность ПМО, полученная в результате разработанной методики, приведена не в стандартных единицах СИ. Кроме того, используемые показатели активности ПМО неясно обозначены на рисунках 20 и 21 (по оси ординат на обоих рисунках указаны  $\Delta$ СПК).

Возможность применения данной методики измерения активности ПМО по СПК для определения числа оборотов вызывает сомнения. Известно, что число оборотов рассчитывается как отношение максимальной скорости реакции ( $V_{max}$ ) к концентрации каталитических центров в реакции. Для определения  $V_{max}$  обычно используются данные серии измерений скорости ферментативной реакции при различных концентрациях субстрата, которые автором проведены не были. Концентрацию каталитических центров обычно приравнивают к молярной концентрации фермента. Однако, при отсутствии данных об уровне инактивации фермента в ходе выделения, хранения, и в условиях опыта такое упрощение некорректно. Кроме того, автор не приводит методику расчёта молярной концентрации фермента. В силу этого, полученные автором данные по числу оборотов ПМО некорректно сравнивать с литературными данными, полученными по другим методикам.

Раздел **Выводы** содержит обоснованные положения, базируются на большом экспериментальном материале, и отражающие результаты работы. В качестве замечаний к выводам можно отметить следующие моменты.

Формулировка первого вывода неполно отражает результаты работы, описанные в главе 5 Результаты, поскольку автор не просто выделил ферменты в чистом виде, а фактически разработал методику их выделения.

Список выводов не полностью совпадает с Положениями, выносимыми на защиту. Положения не содержат информации, приведённой в выводе 1. В свою очередь, пункт 3 Положений не отражён в Выводах.

*Достоверность, новизна и ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики*

В целом, приведённые замечания не снижают значимости работы Булахова А.Г. Достоверность результатов работы Булахова А.Г. основана на применении большого спектра современных физико-химических и генно-инженерных методов, и полном и тщательном анализе полученных данных. Разработана методика выделения в чистом виде трёх различных ПМО, и подробно изучены их каталитические и физико-химические свойства. Для изучения активности ПМО использованы как классический метод, использующий определение



концентрации восстанавливающих сахаров, так и разработанный автором метод, базирующийся на скорости потребления кислорода. Детальные исследования синергизма ПМО с другими ферментами – участниками деструкции ЦСС как на моделях очищенных ферментов, так и в составе ферментного препарата, продуцируемого рекомбинантным штаммом *Penicillium verruculosum* продемонстрировали важную роль ПМО в деструкции ЦСС.

С практической точки зрения, автором получены достоверные и заметные увеличения осаживающей активности ферментных препаратов, продуцируемых рекомбинантным штаммом *Penicillium verruculosum*. Очевидно, что использованный автором подход перспективен для улучшения показателей деструкции ЦСС в промышленности.

#### ***Опубликование результатов диссертации***

Результаты и выводы диссертационной работы Булахова А.Г. представлены в печатных работах – двух статьях, опубликованных в хороших зарубежных журналах (Carbohydrate Research, и PLOS ONE), и двух статьях, опубликованных в ведущих отечественных журналах (Биохимия, и Катализ в промышленности). Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях.

#### ***Содержание автореферата***

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

#### ***Заключение***

Диссертационная работа Александра Глебовича Булахова «Свойства литических полисахаридмонооксигеназ из низших грибов» содержит достоверные и обоснованные результаты, отличающиеся научной новизной, актуальностью, и научно-практической значимостью. Работа отвечает всем требованиям п.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённых Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата химических наук, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 (Биохимия) и 03.01.06 (Биотехнология, в том числе бионанотехнологии).

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук  
НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИ Генетика  
117545, г. Москва, 1-й Дорожный пр. д.  
Тел.: +7 (495) 315-01-83, e-mail: lavrovko@gmail.com

