

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук, заведующего лабораторией молекулярной биоинженерии, главного научного сотрудника Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН **Мирошников**  
**Константина Анатольевича**

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

Диссертационная работа А.Г. Булахова, представленная на защиту, посвящена разностороннему изучению литических полисахаридмонооксигеназ (ПМО), достаточно недавно выделенных в отдельный класс ферментов. В ходе работы были получены в очищенной форме несколько рекомбинантных и нативных ПМО грибов *Thielavia* и *Myceliophthora*, разработана оригинальная методика количественного определения ферментативной активности, изучены их основные ферментативные свойства белков, выявлена роль иона меди в активном центре. На основе полученных данных сконструирована гетерологическая система экспрессии ПМО, а также получен химерный белок, комбинирующий каталитический и субстрат-связывающий домены разных классов целлюлозо-деградирующих ферментов.

Полисахаридмонооксигеназы (ПМО) входят в комплекс секретлируемых ферментов, с помощью которых низшие грибы осуществляют деградацию целлюлозосодержащего сырья. Рекомбинантные гидролитические белки этого комплекса используются в состав препаратов биоконверсии растительных отходов. Несколько лет назад было показано, что ПМО, осуществляющие окислительный разрыв полимерных цепочек целлюлозной матрицы, существенно повышают скорость и полноту переработки

целлюлозосодержащего сырья. Поэтому как поиск и всестороннее исследование новых ПМО и разработка рекомбинантных конструкций их препаративного получения, так и стратегия рациональной белковой инженерии ПМО с повышенной активностью и расширенной субстратной специфичностью относятся к актуальным проблемам и фундаментальной белковой химии, и биотехнологии. Таким образом, представленную диссертационную работу можно отнести к перспективным направлениям научного и технологического поиска. Проведенное исследование имеет очевидную научную новизну, фундаментальную и практическую значимость.

В работе были использованы разнообразные современные научные методы – молекулярное клонирование, белковая инженерия, сканирующая калориметрия, масс-спектрометрия, флуоресцентные биосенсоры. Совокупность полученных экспериментальных результатов позволяет оценить работу А.Г. Булахова как законченный научный труд с обоснованными выводами.

Диссертация А.Г. Булахова построена по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список использованных литературных источников (141 ссылка). Материал диссертации изложен на 144 листах текста и иллюстрирован 7 таблицами и 49 рисунками.

В разделах «Введение» и «Обзор литературы» автор даёт обоснование цели исследований, определяет задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы представлены общие сведения о химическом составе растительной биомассы, формирующей подлежащее переработке целлюлозосодержащее сырьё, компонентах ферментного комплекса его деструкции, истории идентификации ПМО, их классификации, структуре, механизме катализа,

физиологической роли у низших грибов и потенциальных приложениях ПМО в биотехнологии. В целом, обзор литературы отличается хорошей структурированностью, наглядно иллюстрирован, и дает читателю достаточную информацию для оценки предпосылок проведения диссертационного исследования и мирового экспериментального задела в этой области.

Описание проведенных диссертантом исследований приведено в разделе «Материалы и методы». Используемые методы микробиологии, молекулярной биологии, физической химии, белковой химии и энзимологии приведены с детальностью, достаточной для независимого воспроизведения. Обращает на себя внимание большое количество и наглядность иллюстраций. Следует отметить разработанный диссертантом протокол измерения ферментативной активности, позволяющий с высокой точностью получать значения классических параметров ферментативной кинетики. Основные результаты, полученные А.Г. Булаховым: – получение в высокоочищенной форме трёх рекомбинантных и природных ПМО, а также модифицированного химерного белка, разработка метода определения ферментативной активности ПМО и определение основных энзимологических параметров полученных ПМО, выявление роли иона меди и различных доноров электронов в процессе катализа ПМО, доказательство синергизма действия ПМО и других ферментов целлюлазного комплекса низших грибов, конструирование нового штамма-продуцента ПМО *T.reesei* – полностью обоснованы и достоверны.

Шесть выводов работы полностью соответствуют поставленным в начале работы задачам, точно отражают содержание работы, и позволяют считать основную цель работы достигнутой. Научные положения, выносимые на защиту, в полной степени отражены в результатах работы и соответствуют паспортам заявленных специальностей 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнологии (в том числе бионанотехнологии).

По теме диссертации автором опубликованы 4 статьи (в соавторстве) в рецензируемых журналах, индексируемых в базе данных Web of Science и входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК. Апробация работы проведена в виде 9 сообщений на международных и российских научных конференциях. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы А.Г. Булахова «Свойства литических полисахаридмонооксигеназ из низших грибов» полностью отражают содержание диссертации.

В целом, диссертационная работа Александра Глебовича Булахова отличается научной новизной, логичной схемой проведенных исследований, качественными иллюстрациями, поясняющими результаты экспериментов.

Принципиальных замечаний по результатам изучения текста диссертации оппонент не имеет. Некоторую сложность восприятия вызывает недостаточно структурированное изложение многочисленных результатов. В каждой секции раздела «Результаты» исследуемые белки сравниваются по различным параметрам, и для того, чтобы суммарно оценить весь комплекс свойств каждого белка, приходится многократно возвращаться к ранее прочитанному. Желательна была бы сводная таблица, отражающая все свойства каждого из исследованных природных, рекомбинантных и химерных ПМО. В качестве мелких замечаний можно упомянуть обильное использование не строгих определений (научных жаргонизмов) и перевернутую картинку электрофореграммы на стр. 108. На основные результаты и выводы работы, однако, эти недостатки влияния не имеют.

### **Заключение**

Диссертационное исследование **Булахова Александра Глебовича** «Свойства литических полисахаридмонооксигеназ из низших грибов»,

выполненное под руководством д.х.н., профессора Александра Васильевича Гусакова, является законченной научно-квалификационной работой.

По актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований, настоящая работа полностью соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года №335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а ее автор, Булахов Александр Глебович, достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнологии (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент,  
Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» (ИБХ РАН)

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,  
тел. +7(495)335-55-88, e-mail: [kmi@ibch.ru](mailto:kmi@ibch.ru), [kmi@bk.ru](mailto:kmi@bk.ru)

доктор химических наук,  
Константин Анатольевич Мирошников

15 мая 2018 г.

Подпись К.А. Мирошникова заверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН,

д.ф.-м.н.  
Владимир Александрович Олейников

