ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертационную работу Телицина Вадима Дмитриевича «Разработка новых ферментных препаратов с оптимизированным составом и изменёнными свойствами индивидуальных ферментов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Диссертация Вадима Дмитриевича Телицина является частью исследований, проводимых на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по получению и практическому применению ферментных препаратов для биоконверсии растительной биомассы. Целью работы была оптимизация состава целлюлазного комплекса микроскопических грибов рода *Penicillium verruculosum* для увеличения его осахаривающей активности и получение ключевых ферментов этого комплекса с улучшенными свойствами с использованием методов генной инженерии. Автору предстояло исследовать действие мутантных форм целлобиогидролазы и эндоглюканазы с увеличенной удельной активностью, ранее созданных в данной лаборатории при замене одного из сайтов гликозилирования, выделить и изучить их свойства, сравнить с ферментами дикого типа, проверить работу в составе целлюлазных комплексов различного состава с целью обнаружения синергического действия, провести выбор оптимальных композиций и экспериментально исследовать применение комплексов оптимального состава как катализаторов деструкции различных видов целлюлозосодержащего сырья.

Актуальность и научная новизна работы обусловлена тем, что в ней впервые были исследованы возможности использования дегликозилированных форм основных целлюлаз гриба *P.verruculosum* - целлобиогидролазы ЦБГ1д и эндоглюканазы ЭГ2д, а также эндоглюканазы ЭГ1 *T.reesei*, выделенных в индивидуальном виде, для глубокой деструкции целлюлозы, изучено взаимодействие этих ферментов с вспомогательными ферментами полисахаридмонооксигеназой и β-глюкозидазой, определено оптимальное соотношение данных ферментов в комплексе для эффективного осахаривания целлюлозосодержащего сырья. Диссертантом были изучены новые препараты целлюлазного комплекса на основе гриба *P.verruculosum*, содержащие дегликозилированные формы целлобиогидролазы и эндоглюканазы, а также гетерологичную эндоглюканазу *T.reesei.*

Диссертация Телицина В.Д. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, описания материалов, оборудования и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, состоящего из 223 ссылок и приложений. Работа изложена на 148 страницах, содержит 30 рисунков, 21 таблицу и 5 приложений. В разделе «Введение» отмечена актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи диссертационной работы, охарактеризована научная новизна и практическая значимость полученных результатов. В разделе «Обзор литературы» рассмотрены публикации по теме исследования с описанием текущего уровня знаний. В частности, подробно описано целлюлозосодержащее сырье, его основные источники, состав клеточной стенки и состав различных видов целлюлозосодержащего сырья, методы предварительной обработки для последующей деструкции. Приведён список основных и вспомогательных целлюлаз гриба *P.verruculosum*, описано их строение, свойства и субстратная специфичность, а также роль в процессе ферментативной деструкции целлюлозы. Рассмотрены методы увеличения эффективности биодеградации целлюлозы, в том числе методы улучшения свойств ферментов с помощью рационального дизайна, основанного на аминокислотных заменах на примере целлобиогидролазы и эндоглюканазы *P.verruculosum.* Литературный обзор завершается заключением, в котором сформулирована цель диссертационного исследования - оптимизация состава целлюлазного комплекса гриба *P.verruculosum* и улучшение свойств его основных ферментов методами белковой инженерии для получения препарата с высокой осахаривающей способностью, а также связанные с этим задачи.

В экспериментальной части, включающей весьма подробное описание объектов исследования и методики экспериментов, ферментных препаратов, субстратов, использованных реактивов, получение культуральных жидкостей, хроматографических сорбентов и систем, методов определения активности ферментов и концентрации белка, методик ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья, определения состава низкомолекулярных сахаров, выделения и очистки индивидуальных ферментов, анализа состава ферментных препаратов разными способами, идентификации ферментов и определения их адсорбционной способности, приведены также ссылки на оригинальные работы, в которых были предложены используемые методики.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты проведенных экспериментов, их обобщение и анализ. Глава состоит из 7 разделов. В первом разделе представлена характеристика используемых ферментов, начиная от выделения индивидуальных ферментов и до краткого описания их свойств. Во втором небольшом разделе проведено сравнение гидролитической способности индивидуальных целлюлаз. В третьем разделе представлены результаты по изучению синергии между основными (эндоглюканаза и целлобиогидролаза) и вспомогательными (полисахаридмонооксигеназа, β-глюкозидаза) компонентами целлюлазного комплекса. В четвертом, наиболее крупном разделе даны результаты изучения гидролиза целлюлозосодержащего сырья смесями индивидуальных ферментов, рассмотрена деструкции различного исходного сырья, в том числе подвергнутого предобработке различными способами: микрокристаллической целлюлозы, сульфатной небеленой лиственной целлюлозы, сульфатной небеленой хвойной целлюлозы, тростника, предобработанного щелочью. В пятом крупном разделе описано получение и свойства новых ферментных препаратов, содержащих дегликозилированные формы целлобиогидролазы и эндоглюканазы, а также гетерологичную эндоглюканазу: от скрининга культуральной жидкости рекомбинантных штаммов, измерения ферментативной активности до определения состава комплексных ферментных препаратов. В шестом разделе сжато представлены результаты по свойствам комплексного ферментного препарата, содержащего вспомогательные ферменты (полисахаридмонооксигеназу и β-глюкозидазу). В седьмом разделе весьма подробно охарактеризована гидролитическая способность новых целлюлолитических ферментных препаратов, представлены результаты гидролиза различных видов целлюлозосодержащего сырья, в том числе по изучению возможности осуществления процесса при превращении сверхвысоких концентраций исходного субстрата.

В Заключении подведены итоги проведенного исследования и приведены результаты сравнительного исследования гидролитической способности нативных и дегликозилированных форм основных целлюлолитических ферментов гриба *P.verruculosum* – целлобиогидролазы и эндоглюканазы, а также гидролитической способности эндоглюканазы *T.reesei*, их взаимодействия со вспомогательными ферментами полисахаридмонооксигеназой и β-глюкозидазой, изучения гидролиза разных видов целлюлозосодержащего сырья с использованием полученных новых

ферментных препаратов как в индивидуальном виде, так и в смесях со вспомогательными ферментами, отобраны наиболее эффективные по составу комплексы ферментов для осахаривания целлюлозосодержащего сырья.

Описание работы завершают выводы, но это, скорее, перечисление основных результатов.

Наиболее значимыми результатами диссертационной работы Телицина В.Д., по моему мнению, являются:

1. Установление того факта, что по гидролитическому превращению различных видов целлюлозосодержащего сырья дегликозилированные мутантные формы целлобиогидролазы и эндоглюканазы превосходят нативные формы этих ферментов, что позволяет увеличить выход продуктов вплоть до 55-66%;
2. Подбор оптимальных сочетаний основных (целлобиогидролазы и эндоглюканазы) и вспомогательных (полисахаридмонооксигеназы и β-глюкозидазы) ферментов в составе целлюлазного комплекса для практического использования.

Биотехнологическая значимость этих достижений заключается в том, что показан и обоснован конкретный путь увеличения эффективности биокаталитической деструкции целлюлозосодержащего сырья, важнейшего этапа превращения возобновляемого сырья в полезные продукты при последующем использовании других технологий живых систем.

Следует отметить некоторые недочеты диссертационной работы и ее оформления. Автор проводит целый ряд сравнений активности и эффективности действия ферментов, а также их композиций и при этом иногда встречаются несоответствия между многочисленными данными, представленными в таблицах, и комментариями в тексте. Так, при обсуждении данных таблицы 1 в диссертации и автореферате, а именно значений каталитической константы действия полисахаридмонооксигеназы, есть противоречия. Странно, как при уменьшении значения kcat и увеличении Km при переходе от препарата ЭГ2н к ЭГ2д скорость реакции увеличивается (см. колонку КМЦ в таблице 1)? При этом непонятно, на основе каких данных автор делает вывод о том, что ЭГ2д обладает каталитическими преимуществами.

Не объяснено, что такое температурная стабильность в таблице 2.

В подписи к Таблице 4: Выход ВС (г/л) после 96 ч гидролиза разных видов ЦСС под воздействием смесей индивидуальных ферментов представлен при суммарной концентрации 1 мг/г субстрата или фермента?

Что такое pH-оптимум работы целлюлазного комплекса?

Спорным представляется использование термина «синергетический эффект» при изучении синергии (совместного действия) между основными и вспомогательными ферментами целлюлазного комплекса и далее в тексте; здесь уместен термин «синергический эффект».

В целом диссертация Телицина В.Д. отражает большое по объему и важное по научно-практической значимости полученных результатов научное исследование. Приведённые замечания не снижают высокий уровень работы. Научная значимость проведенного исследования заключается в экспериментальном доказательстве преимуществ дегликозилированных мутантных форм целлобиогидролазы и эндоглюканазы при деструкции разных видов целлюлозосодержащего сырья, что имеет несомненное практическое значение. На практическую значимость работы и квалификацию автора указывает также его участие в выполнении ряда проектов: "Технологическая платформа БРИКС для создания интегрированных устойчивых биопроцессов получения биотоплива и сопутствующих продуктов из сельскохозяйственных отходов. Акроним: BEST: Возобновляемая биоэнергетика на основе экологически безопасных технологий" (РФФИ, 2018-2020); "Исследования по подбору оптимальных условий гидролиза тростника" (Договор 01-05 от 10.05.2023); Гос. задание МГУ "Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды" (№ 121041500039-8); «Подбор оптимальных ферментных комплексов для получения простых сахаров из целлюлозосодержащего сырья» (Договор 0290/2022/1041 от 04.03.2022). Достоверность результатов, полученных в диссертационной работе Телицина В.Д., не вызывает сомнений. Экспериментальные данные получены с использованием точных инструментальных методов, проведены повторные и контрольные измерения, обработка полученных данных проведена при помощи математической статистики. Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых международных и российских научных журналах. Результаты работы представлены и обсуждены на

всероссийских и международных научных конференциях и выставках. Использованные методики адекватны задачам исследования, проведенные расчеты корректны, полученные экспериментальные количественные закономерности статистически достоверны. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, поддерживаются полученными результатами. Результаты диссертационной работы Телицина В.Д. представлены в 9 статьях, опубликованных в специализированных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI. Сделанные выводы соответствуют поставленным целям и полученным результатам. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

Диссертация Телицина В.Д. представляет завершенную работу, выполненную на высоком современном научно-методическом уровне; ее содержание полностью соответствует требованиям, установленным МГУ имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6 «Биотехнология», а также критериям, определённым в пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Работа оформлена, согласно приложениям №5,6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Соискатель Телицин Вадим Дмитриевич заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент:

Швядас Витаутас-Юозапас Каятоно

Доктор химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»
Профессор факультета биоинженерии и биоинформатики
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Российская Федерация, Москва 119234, ул. Колмогорова, 1 стр.73.
Тел.: +7 (495) 939-23-55, электронная почта: vytas@belozersky.msu.ru

Швядас В.К.

Подпись профессора, доктора химических наук Швядаса В.К. заверяю:

ПОДПИСЬ УДОСТОВЕРЯЮ
ЗАВ КАНЦЕЛЯРИЕЙ
Н Н СИДОРОВА

«04» июля 2025