

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **Кислицина Валерия Юрьевича**
«Роль транскрипционных факторов в биосинтезе целлюлаз
мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.6. Биотехнология

В диссертационной работе Кислицина В. Ю. исследовано влияние основных транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию целлюлаз в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum*, являющимся промышленным продуцентом целлюлазных препаратов. С помощью полученных данных на основе гриба *P. verruculosum* был разработан новый продуцент целлюлазного препарата, превосходящий по гидролитической активности ферментный препарат, получаемый с помощью применявшего ранее в промышленности штамма *P. verruculosum* B1-221-151.

Актуальность исследования

Тема исследования актуальна, поскольку препараты целлюлаз и других карбогидраз, получаемые с помощью мицелиальных грибов широко используются в сельском хозяйстве, целлюлозно-бумажной, текстильной и других отраслях промышленности. Вместе с тем, улучшение производственных характеристик продуцентов таких, как продуктивность, состав и активность секретируемого комплекса, продолжительность культивирования необходимая для наработки препарата, по-прежнему остаётся важной задачей биотехнологии. Для решения этой задачи в настоящее время активно применяются методы синтетической биологии, направленные на модификацию механизмов контроля экспрессии соответствующих ферментов. Однако, у разных видов мицелиальных грибов этот механизм может отличаться, в связи с чем требуется его отдельное изучение у каждого хозяйственно ценного вида, к которым, несомненно, относится и гриб *P. verruculosum*. Данный вид обладает высокоактивным комплексом целлюлаз, и ранее с помощью мутагенеза был получен штамм, секретирующий до 60 грамм белка на литр культуральной жидкости, основную часть которого составляют целлюлазы.

Структура диссертации

Диссертация Кислицина В. Ю. содержит все необходимые разделы, а именно «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Список литературы» и «Приложения». Работа изложена на 128 страницах, содержит 48 рисунков и 25 таблиц.

В разделе «Введение» отмечена актуальность темы работы, сформулированы цели и задачи исследования, разъяснены научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Раздел «Обзор литературы» описывает текущий уровень знаний в ряде областей биологии, связанных с темой диссертационной работы. В частности, подробно описаны механизмы регуляции транскрипции гликозил-гидролаз у мицелиальных грибов, применяемые способы повышения продуктивности мицелиальных грибов и методы геномного редактирования технологией CRISPR-Cas9 в мицелиальных грибах. Раздел заканчивается краткой сводкой возможных способов улучшения производственных характеристик мицелиального гриба *P. verruculosum*.

Глава «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание методов, использованных в работе, и ссылки на оригинальные работы, в которых были разработаны описанные методики.

В главе «Результаты и обсуждение» приведены и проанализированы результаты проведенных экспериментов. Глава состоит из 4 разделов. Первый раздел описывает адаптацию метода редактирования генома CRISPR-Cas9 для мицелиального гриба *P. verruculosum* с целью использования его в дальнейшей работе по изучению роли транскрипционных факторов. Последующие два раздела описывают результаты изучения регуляции транскрипции генов целлюлаз под действием различных транскрипционных факторов и веществ-индукторов. В четвёртом разделе приводятся описывается применение полученного в работе нового реципиентного штамма *P. verruculosum* с нокаутом гена транскрипционного фактора *tacA* для экспрессии гетерологичного гена β -глюкозидазы *A. niger*, и испытание нового ферментного препарата при гидролизе целлюлозосодержащих материалов.

В главе «Заключение» суммированы результаты исследования.

Степень достоверности результатов и обоснованности выводов, сделанных автором, а также научная новизна и практическая значимость исследования

Полученные в работе результаты полностью подтверждены экспериментальными данными – использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны; полученные экспериментальные закономерности статистически достоверны. Сформулированные в тексте диссертации научные положения и выводы полностью подтверждаются полученными результатами.

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается в установлении роли транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR, TacA в регуляции экспрессии целлюлаз у мицелиального гриба *P. verruculosum*.

Установлено, что конститутивная экспрессия гена *xlnR* в грибе *P. verruculosum* значительно повышает ксиланазную активность ферментного комплекса. Показано, что транскрипционный фактор TacA в грибе *P. verruculosum*, в отличие от своего гомолога в грибе *P. oxalicum*, является репрессором транскрипции целлюлаз.

С практической точки зрения, адаптированная в ходе работы методика редактирования генома на основе технологии CRISPR-Cas9 для мицелиального гриба *P. verruculosum* B1-221-151 позволяет получать штаммы с направленными нокаутами генов, что может быть использовано как для изучения роли этих генов, так и для получения новых реципиентных штаммов с улучшенными свойствами. Также получен штамм *P. verruculosum* $\Delta tacA:\Delta niaD$ с увеличенной активностью целлюлаз, и ускоренным периодом культивирования для получения ферментного препарата, по сравнению ранее применявшимся штаммом *P. verruculosum* B1-221-151.

Кроме того, были получены новые рекомбинантные штаммы *P. verruculosum*, обладающие высокой авицелазной (целлобиогидролазной) и β -глюкозидазной активностью. Гидролитическая способность нового ферментного препарата dT16-13 была в 1.5 раза выше, чем активность ферментного препарата, получаемого от исходного штамма B1-221-151.

Опубликование результатов диссертации

Результаты и выводы диссертационной работы Кислицина В. Ю. представлены в 7 статьях, опубликованных в специализированных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI.

Замечания к работе

К работе сформированы следующие замечания:

Замечания по разделу «Введение».

Несмотря на то, в разделе «Результаты и их обсуждение» изложено большое по объёму, логично построенное и законченное исследование, раздел «Введение» написан таким образом, что он затрудняет восприятие результатов. Из пояснений, данных во Введении, не совсем ясны проблематика, послужившая стимулом для исследований. Приводится практическая проблема, и возможная причина её возникновения, а именно:

1) «у рекомбинантных штаммов, характеризующихся высокой продукцией целевого фермента, наблюдается снижение общей продуктивности по секретируемому белку в 2 и более раза».

2) «возможной причиной падения продуктивности рекомбинантных штаммов-монопредуцентов *P. verruculosum* может являться нарушение регуляторного механизма в случае встраивания в геном гриба большого числа копий рекомбинантных генов под промотором гена *cbh1*»

Во-первых, неясно, как у уже сделанного штамма-продуцента может сочетаться высокая (т.е., повысившаяся по сравнению с исходным штаммом) продуктивность по определённому ферменту с упавшей (по сравнению с исходным штаммом) продуктивностью по общему секретируемому белку.

Во-вторых, неясно, что такое «монопродуцент», т.к. в работе описываются продуценты комплекса как минимум трёх целлюлолитических ферментов.

В-третьих, в задачах исследования отсутствует задача по конструированию штамма с большим числом геномных копий рекомбинантных генов под промотором гена *cbh1*, и проверке эффекта изменения экспрессии исследуемых регуляторов в таком штамме на продуктивность по целевым ферментам.

Формулировка задачи 5 не совсем корректна с научной точки зрения, т.к. гидролитической активностью обладает не столько штамм (как биомасса или отдельные клетки), сколько комплекс ферментов, которые он секретирует.

Замечания по разделу «Результаты и их обсуждение»

Названия подразделов в нём не совсем соответствуют формулировкам поставленных задач, что затрудняет восприятие материала. Например, Раздел 5.2, следующий после раздела 5.1 про адаптацию CRISPR/Cas системы редактирования, называется «Исследование механизма активации промотора *cbh1 P. verruculosum*», а не «Клонирование генов транскрипционных факторов *Clr1*, *Clr2*, *XlnR* и *TacA P. verruculosum*», как можно было бы ожидать, исходя из списка задач. Задача по исследованию механизма активации промотора *cbh1* отсутствует во Введении. То же касается связи названий остальных подразделов «Результатов и их обсуждения» с поставленными задачами.

Замечания по разделу «Заключение»

В разделе «Заключение» (как и в выводах) отсутствует информация о том, какие именно проблемы с регуляцией активности промотора гена *cbh1* оказались «узким местом» для продуктивности по секретируемому белку и по целевым ферментам.

Заключение.

Достоверность результатов, полученных автором в рамках проведенных исследований, не вызывает сомнений. Приведённые замечания не снижают уровня, научной и практической значимости работы. Диссертация Кислицина В. Ю. является завершённой работой, выполненной на хорошем методическом уровне с использованием всех необходимых современных методов.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6 «Биотехнология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в

Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кислицин Валерий Юрьевич заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук
начальник лаборатории молекулярной биотехнологии,
Курчатовский комплекс нано-, био-, инфо-, когнитивных и
социогуманитарных наук и природоподобных технологий,
ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Лавров Константин Валерьевич

01 ноября 2023 года

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 315-01-83, e-mail: lavrov.ko@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.02.07 Генетика

Адрес места работы:

117545, Россия, г. Москва 1-й Дорожный проезд, д. 1

Тел.: +7 (495) 315-01-83,

Подпись К.В. Лаврова заверяю:

Главный ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»

Борисов Кирилл Евгеньевич

Борисов К.Е.

« ____ » _____ 2023 г.