

ОТЗЫВ

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

Биотехнология

Диссертационная работа В.Д. Телицина относится к весьма динамично развивающемуся направлению прикладной биотехнологии, связанному с разработкой методов ферментативного передела возобновляемого полисахаридного сырья. Прогресс в данной области зависит от создания усовершенствованных ферментных препаратов с увеличенной каталитической активностью для повышения эффективности биотехнологической переработки различных видов природной растительной биомассы. Продуцентами наиболее активных ферментных препаратов для деструкции такого сырья являются микроскопические грибы рода *Penicillium*. Их целлюлозолитические комплексы содержат в своем составе «классический» набор гидролаз трех типов: эндоглюканаза (ЭГ), целлюбиогидролаза (ЦБГ) и β -глюкозидаза (БГЛ). Увеличивая активность основных ферментов комплекса (ЦБГ и ЭГ) и добавляя в комплекс новые ферменты (ЭГ1 из *Trichoderma reesei* и собственную полисахаридмонооксигеназу (ПМО) *Penicillium verruculosum*), можно получить препараты, обеспечивающие более эффективную конверсию целлюлозного сырья.

Актуальность работ, посвященных получению новых препаратов с увеличенной осахаривающей способностью, определяется возможностью использования этих препаратов в процессах биотехнологической переработки возобновляемого растительного сырья до глюкозы, и, далее, получения широкого круга коммерчески востребованных продуктов, таких как этилен, органические спирты и кислоты, углеводы и углеводороды, полимеры и кормовые продукты, биотопливо и биопластики. Нужно подчеркнуть, что ключевым этапом преобразования растительного сырья в полезные продукты является гидролиз полисахаридов, составляющих его основу (в первую очередь целлюлозы), до моносахаридов (в первую очередь глюкозы) с использованием ферментных препаратов.

Поскольку одними из основных действующих компонентов используемых ферментативных препаратов являются целлюлазы, исследование и улучшение их

свойств и изучение их взаимодействия друг с другом представляет не только несомненный фундаментальный, но и прикладной интерес.

Целью диссертационной работы Телицина В.Д. была оптимизация состава целлюлазного комплекса гриба *P. verruculosum* и улучшение свойств основных ферментов, входящих в его состав, для получения ферментных препаратов с высокой гидролитической способностью. Следует отметить, что оптимизация состава препаратов проводилась не только за счёт собственных ферментов целлюлазного комплекса гриба *P. verruculosum*, но и с использованием ферментов из других источников (эндоглюканазы 1 из *T. reesei*), что может расширить субстратную специфичность и увеличить гидролитическую способность исходного ферментного комплекса. Создание отдельно препарата основных целлюлаз и отдельно препарата вспомогательных ферментов упрощает задачу получения соответствующих штаммов-продуцентов и позволяет более гибко использовать полученные препараты при решении практических задач.

Научная новизна работы состоит в изучении совместного действия ПМО (как вспомогательного фермента) и основных ферментов целлюлазного комплекса при гидролизе целлюлозосодержащего сырья, в том числе дегликозилированных форм основных ферментов (ЦБГ1д и ЭГ2д) *P. verruculosum* и ЭГ1 *T. reesei*. В работе Телицина В.Д. был продемонстрирован синергизм между ПМО и основными целлюлазами на начальном этапе процесса гидролиза целлюлозы и ослабление этого эффекта при более длительном её гидролизе.

Была оценена гидролитическая способность исходных и мутантных форм ЦБГ1 и ЭГ2 *P. verruculosum* и ЭГ1 *T. reesei*. Показано, что ферменты можно расположить в ряд ЦБГ1д-ЦБГ1н-ЭГ1-ЭГ2д-ЭГ2н в порядке убывания их гидролитической способности. Полученные данные подтверждают преимущество мутантных форм ферментов над исходными.

Изучение взаимодействия ферментов в их многокомпонентных смесях в реакционной смеси при длительном гидролизе различных видов целлюлозосодержащего сырья позволило подобрать оптимальный состав ферментного комплекса, и получить новые ферментные препараты на основе различных штаммов гриба *P. verruculosum*, содержащие дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д и гетерологичную ЭГ1 *T. reesei*.

Практическое значение имеют результаты, полученные при исследовании способов увеличения гидролитической способности ферментных целлюлазных комплексов микроскопических грибов за счёт улучшения свойств индивидуальных

ферментов и оптимизации состава комплекса – это открывает широкие перспективы для создания более эффективных промышленных целлюлазных ферментных препаратов. Полученные в диссертационной работе препараты могут быть применены в промышленных процессах биоконверсии растительного сырья и могут стать заменой уже имеющихся на рынке препаратов или добавками (улучшителями) к ним.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на специализированных отечественных и международных конференциях и изложены в 9 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index» и в базах «Scopus» и «Web of Science», а также в 3 публикациях в сборниках конференций, индексируемых в базе «Scopus». Кроме того, результаты диссертационной работы представлены на 5 научных российских и международных конференциях.

Структура диссертации. Диссертационная работа Телицина В.Д. состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы (223 источника) и приложения. Работа изложена на 148 страницах, включает 30 рисунков, 21 таблицу и 5 приложений.

Во «Введении» обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи работы, также приведены выводы, научная и практическая значимость полученных результатов. Глава «Обзор литературы» состоит из 3 разделов и включает в себя описание свойств возобновляемого растительного сырья, принципов биотехнологической переработки сырья, описание биохимических и каталитических свойств целлюлаз. Описаны способы увеличения эффективности биodeградации целлюлозы, в том числе с помощью изменения каталитических свойств индивидуальных ферментов путём удаления сайтов гликозилирования. Обзор литературы достаточно полно отражает состояние проблемы по теме диссертации и позволяет обосновать цель исследования.

В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе реагенты и материалы, приведены экспериментальные протоколы проведённых экспериментов. Применение современных методов аналитической химии и биохимии и использование большого числа ферментов и препаратов позволило получить объективные и достоверные результаты.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 7 глав. Большая часть работы (главы 5-8) посвящена описанию свойств гомогенных ферментов, применяемых в индивидуальном виде и в смесях друг с другом. В главе 5 приводится общая характеристика использованных в работе ферментов и их свойства, что значительно

облегчает восприятие материала. В главе 6 изложены результаты изучения гидролитической способности индивидуальных целлюлаз, в главе 7 – результаты исследования взаимодействия основных и вспомогательных ферментов, в главе 8 описан подбор оптимального состава смеси индивидуальных ферментов при гидролизе различных видов целлюлозосодержащего сырья.

Главы 9, 10 и 11 посвящены описанию свойств полученных в работе ферментных препаратов. В главе 9 описан процесс отбора препаратов основных целлюлаз, приведены их состав и свойства, глава 10 посвящена описанию свойств препарата с увеличенным содержанием ПМО и БГЛ – вспомогательных ферментов целлюлазного комплекса. В главе 11 приведены результаты экспериментов по сравнению гидролитической способности полученных препаратов основных целлюлаз как в индивидуальном виде, так и в смесях с препаратом вспомогательных ферментов.

Все использованные в работе ферменты были выделены в гомогенном виде, охарактеризована их субстратная специфичность (определена их активность по отношению к широкому кругу субстратов), приведены их биохимические и физико-химические свойства и кинетические параметры по отношению к специфическим субстратам. Мутантные формы ЦБГ1д и ЭГ2д проявляли повышенную активность по отношению к специфическим субстратам, биохимические и физико-химические свойства данных ферментов не отличались от аналогичных свойств нативных форм.

Исследован синергизм при гидролизе целлюлозы между основными и вспомогательными ферментами путем анализа активности мультиферментных композиций с различным соотношением ферментов в них. В случае использования БГЛ как вспомогательного фермента установлено, что оптимальным было наличие 10% БГЛ от общего содержания ферментов в реакционной смеси; для ПМО оптимальным содержание в реакционной смеси было 5-15%.

Для получения ферментных препаратов основных целлюлаз был проведён скрининг большого количества рекомбинантных штаммов *P. verruculosum*, продуцирующих целевые ферменты (ЦБГ1д, ЭГ2д и ЭГ1) в различных комбинациях. Отбор проводился по наличию полос целевых ферментов на электрофореграммах белков культуральных жидкостей трансформантов, уровню активностей по отношению к специфическим субстратам и способности разжижать сульфатную небеленую хвойную целлюлозу в течение 48 ч гидролиза. Это позволило получить препараты с высоким содержанием ЦБГ1д, ЭГ2д, обоих этих ферментов, а также препараты, содержащие гетерологичную ЭГ1. Препараты были подробно охарактеризованы – определены их активности по отношению к различным видам целлюлозосодержащего

сырья и охарактеризован состав методом хроматографического фракционирования. Содержание ключевых ферментов варьировалось от 16 до 39% ЦБГ1 (26–53% в совокупности с ЦБГ2), от 1 до 35% ЭГ2 и до 3% ЭГ1. Аналогичным образом был охарактеризован препарат обоих вспомогательных ферментов, содержание целевых ферментов в нем составило 34% ПМО и 43% БГЛ.

Гидролитическая способность полученных новых препаратов основных целлюлаз в индивидуальном виде и в смесях с препаратами вспомогательных ферментов изучалась по отношению к ряду целлюлозосодержащего сырья. Показано, что препарат с высоким содержанием одновременно ЦБГ1д и ЭГ1 (при использовании его как в индивидуальном виде, так и в смеси с препаратами вспомогательных ферментов) оказался значительно эффективнее, чем другие использованные в работе препараты.

Положения, выводы и рекомендации диссертационной работы обоснованы и подтверждены результатами экспериментальных исследований. В автореферате диссертации изложены основные результаты исследований, а также заключения и выводы, содержащихся в диссертационной работе.

По диссертации Телицина В.Д. есть замечания:

1. В главе 8, посвящённой гидролизу сырья смесями индивидуальных ферментов, приводятся соотношения ферментов, которые названы оптимальными, но не приводится обоснование этой оценки «оптимальный» ни в самой работе, ни в ссылках на какие-либо литературные источники.
2. В главе 9, посвящённой описанию новых ферментных препаратов, указано, что проводился масс-спектрометрический анализ для подтверждения наличия в них эндоглюканазы 1, но не говорится о подтверждении наличия мутантных форм целлюбиогидралазы 1 и эндоглюканазы 2. Проводил ли автор эти исследования и если да, то почему не привёл результаты?
3. В разделе 11.2, посвящённом гидролизу сверхвысоких концентраций субстратов, для более корректного сравнения свойств ферментных препаратов необходимо привести характеристики и состав препаратов, использованных в качестве контрольных. Были ли проведены подобные эксперименты с препаратом В1-537, полученным с помощью штамма-реципиента, который использовался в качестве контрольного во всех предыдущих экспериментах, и если да, то почему не приведены данные этих экспериментов?

4. Исследование разработанных ФП проведено при использовании промышленных полисахаридных продуктов и предобработанного щёлочью тростника в качестве субстратов. Было бы весьма интересно сопоставить активности известных ранее и созданных ФП на примере осахаривания более сложного, но и более практически значимого сырья, которым являются древесные опилки, солома и другие ЦСС отходы. Однако можно предположить, что такие исследования выходят за рамки данной диссертационной работы и будут развиты в дальнейшем в данной лаборатории.
5. В автореферате следовало бы представить пример масс-спектров, полученных в результате масс-спектрометрического анализа ферментов, а также пример хроматограмм, полученных для описания состава новых препаратов (эти данные приведены в диссертации).
6. В тексте встречается некоторое количество опечаток, не мешающих восприятию информации. Еще одним замечанием по оформлению автореферата – неудачная компоновка списка сокращений (стр. 6), принятых в тексте.

Указанные замечания не носят принципиального характера, не умаляют значимости и не снижают общей высокой оценки диссертационного исследования Телицина В.Д., которая является законченной научно-квалификационной работой, посвящённой описанию синергетических эффектов, наблюдаемых при использовании нативных и мутантных форм основных целлюлаз гриба *P. verruculosum* и ЭГ1 *T. reesei* в смесях друг с другом и с вспомогательными ферментами (ПМО, БГЛ), а также описанию свойств и осахаривающей способности новых препаратов, содержащих вышеперечисленные ферменты.

Диссертация Телицина Вадима Дмитриевича полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к научно-квалификационным работам. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, 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 Телицин Вадим Дмитриевич, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией химии гликоконъюгатов
ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН»,
член-корр. РАН, доктор химических наук, профессор

Нифантьев Николай Эдуардович

Контактные данные:

Телефон: 8-499-135-87-84, E-mail: nen@ioc.ac.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом была защищена диссертация:

02.00.10 – Биоорганическая химия, 02.00.03 – органическая химия

Адрес места работы: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47

Подпись чл.-корр. РАН Н.Э. Нифантьева заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского

К.Х.Н.



Коршевец И.К.

06.06.2025