

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**

Диссертация Валерия Юрьевича Кислицина является частью исследований, проводимых в Лаборатории биотехнологии ферментов в Институте биохимии имени Баха РАН по созданию штаммов-продуцентов ферментов. В диссертационной работе проведено изучение роли транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию целлюлаз в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum*. Полученные результаты важны как для понимания регуляции экспрессии целлюлаз у мицелиальных грибов, так и для оптимизации технологий промышленного производства ферментных препаратов. Актуальность темы не вызывает сомнений, поскольку препараты целлюлаз и других карбогидраз востребованы и используются в разных областях, в первую очередь в целлюлознобумажной и текстильной промышленности, а также сельском хозяйстве. Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* служит основой при разработке продуцентов ферментов для различных технологических задач. Хотя промышленные штаммы В1-221-151 и В1-537 продуцируют комплекс гидролитических ферментов с образованием до 60 грамм белка на литр культуральной жидкости, основную часть которого составляют целлюлазы, важной задачей является оптимизация биосинтеза ферментов и состава компонентов комплекса. Целью диссертационной работы В.Ю. Кислицина было получение штаммов-продуцентов нового поколения, созданных на основе изучения и понимания регуляции экспрессии целлюлаз в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum* транскрипционными факторами. Важным итогом работы стало получение штамма-продуцента *P. verruculosum* dT16-13, способного производить целлюлазный комплекс, обогащённый β-глюкозидазой *Aspergillus niger*, и превосходящего по эффективности биосинтеза комплекса целлюлаз используемым в промышленности штаммом *P. verruculosum* В1-221-151.

Диссертация Кислицина В.Ю. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и 6 приложений с представлением нуклеотидной и аминокислотной последовательности изученных автором четырех транскрипционных факторов, а также рекомендуемых условий культивирования созданных штаммов-продуцентов (*P. verruculosum* Δ_{atcA} для получения гидролитического ферментного препарата и *P. verruculosum* dT16-13 для получения гидролитического ферментного препарата, обогащённого β-глюкозидазой *A. niger*). Работа изложена на 128 страницах, содержит 48 рисунков и 25 таблиц.

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 описаны механизмы регуляции транскрипции гликозилгидролаз у мицелиальных грибов, существующие подходы для повышения продуктивности и методы геномного редактирования технологией CRISPR-Cas9. Литературный обзор завершается заключением, в котором сформулировано основное направление диссертационного исследования.

В разделе «Материалы и методы» весьма подробно описаны использованные в работе методы и приведены ссылки на оригинальные работы, в которых были предложены описанные методики.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты проведенных экспериментов, их обобщение и анализ. Глава состоит из 4 разделов. Первый раздел описывает адаптацию метода редактирования генома CRISPR-Cas9 для мицелиального гриба *P. verruculosum* с целью его использования в дальнейшей работе по изучению функций транскрипционных факторов. В следующих двух разделах описываются результаты изучения регуляции транскрипции генов целлюлаз под действием различных транскрипционных факторов и индукторов. В четвёртом разделе представлены результаты, характеризующие особенности и отличительные свойства полученного в работе нового реципиентного штамма *P. verruculosum* при нокауте транскрипционного фактора TасА, по экспрессии гетерологичного гена β -глюкозидазы *A. niger* и испытаний нового ферментного препарата при гидролизе микрокристаллической целлюлозы и измельчённой осины.

В Заключении подведены итоги проведенного исследования и приведена вероятная схема регуляции транскрипции генов целлюлаз в грибе *P. verruculosum*. Описание работы завершают выводы, но это, скорее, перечисление основных результатов.

Наиболее значимым результатом диссертационной работы Кислицина В.Ю., по моему мнению, является получение нового штамма-реципиента гриба *Penicillium verruculosum* с нокаутом негативного фактора транскрипции TасА, что привело к увеличению продуктивности гриба. Биотехнологическая значимость этого достижения заключается в том, что наибольшая продуктивность гриба достигается к 96-и часам культивирования, в отличие от исходного штамма, где секреция целевых белков максимальна к 144-м часам ферментации. Важно отметить, что состав секретлируемого комплекса ферментов, продуцируемого новым штаммом к 96-и часам, представляют, в основном, ключевые ферменты целлюлазного комплекса, необходимые для эффективного

гидролиза целлюлозосодержащего сырья. На основе нового штамма *Penicillium verruculosum* deltaTacA диссертантом также был получен штамм *Penicillium verruculosum* 16-13 с гетерологичной экспрессией β -глюкозидазы *A. niger*, обладающий наиболее высокой гидролитической способностью по сравнению с имеющимися препаратами за счет оптимального содержания β -глюкозидазы (24%) в составе секретируемого комплекса ферментов.

Следует отметить некоторые недочеты диссертационной работы и ее оформления. Автор проводит целый ряд сравнений полученных им новых штаммов-продуцентов с ранее известными и при этом комментарий в тексте не всегда согласуется с данными рисунков. Так, при характеристике штамма *P. verruculosum* Δ tacA автор отмечает максимальное (и более быстрое) накопление комплекса ферментов к 96 часам, в то время как при использовании контрольного штамма-продуцента максимальная концентрация ферментов наблюдается к 144 часам. При этом в тексте отмечается, что целлюлозгидролазная (авицелазная) активность у штамма *P. verruculosum* Δ tacA превышает максимальный уровень биосинтеза контрольным штаммом в 2 раза, в то время как наблюдаемый эффект существенно выше (рисунок 11А в автореферате, 35А в диссертации).

На рисунке 2 не показаны восстанавливающий и не восстанавливающий концы целлюлозной микрофибрилы, хотя в тексте это упоминается. На рисунке 21 из подписи к рисунку непонятно, чем отличаются дорожки 1-3 и 4-6. Непонятно разделение разделов 5.1.4 и 5.1.5 между собой – фактически это единая часть.

В списке опубликованных диссертантом статей (публикация 4 в автореферате) два автора потеряны в переводном варианте.

В целом диссертация Кислицина В.Ю. отражает большое по объему и важное по полученным результатам научное исследование. Приведённые замечания не снижают высокий уровень работы. Научная значимость проведенного исследования заключается в выяснении функционального значения транскрипционных факторов Clr1, Clr2, XlnR и TacA в регуляции экспрессии целлюлаз мицелиального гриба *P. verruculosum*. Установлено, что конститутивная экспрессия гена xlnR значительно повышает продуктивность, β -глюкозидазную и ксиланазную активности ферментного комплекса. Показано, что транскрипционный фактор TacA негативно регулирует транскрипцию целлюлаз. Практически значимые результаты получены автором при умелом использовании методики редактирования генома мицелиального гриба *P. verruculosum* В1-221-151 на основе технологии CRISPR-Cas9, что позволило создать реципиентные штаммы с нокаутами по маркерному гену нитратредуктазы и целевому гену. Это было использовано

для получения новых реципиентных штаммов с улучшенными свойствами и может быть применено в дальнейшем при углубленном изучении роли этих генов.

Достоверность результатов, полученных в диссертационной работе Кислицина В.Ю., не вызывает сомнений. Использованные методики адекватны задачам исследования, проведенные расчеты корректны, полученные экспериментальные количественные закономерности статистически достоверны. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, подтверждаются полученными результатами.

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

Диссертация Кислицина В. Ю. представляет завершённую работу, выполненную на высоком современном научно-методическом уровне; ее содержание полностью соответствует требованиям, установленным МГУ им. 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 Кислицин Валерий Юрьевич заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

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:

« ____ » _____ 2023

