

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Доценко Анны Сергеевны «Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования целлюлаз мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа Анны Сергеевны Доценко посвящена апробированию нового подхода к белковой инженерии важных для биотехнологии ферментов целлюлолитического комплекса из *Penicillium verruculosum*, а именно изучению влияния степени гликозилирования аминокислотных остатков ферментов на их целлюлолитическую активность.

Актуальность темы диссертации

Значительная часть энергии, используемой человечеством, имеет Солнечное происхождение. Это, в первую очередь, ископаемые энергоносители (нефть, уголь, природный газ), которые вовлечены в генерацию электроэнергии, тепла, в производство топлива. Во вторую очередь, это растительная биомасса, традиционно используемая для генерации тепла в малых хозяйствах – дрова, торф, пеллеты. В то же время, сегодня растительная биомасса всё активнее используется для производства топлива – биоэтанола, биодизелей.

В результате всего лишь векового использования ископаемых энергоносителей для энергетики стала хорошо видна перспектива истощения их запасов. Таким образом, Солнечная энергия, запасённая в ископаемых энергоносителях, неуклонно заканчивается, в то время как она продолжает запасаться в современной растительной биомассе. С другой стороны, ископаемые энергоносители являются ценнейшим сырьём для химического синтеза, и их сжигание подобно топке печей ассигнациями. В то же время запасы растительной биомассы сравнимы с запасами ископаемых энергоносителей, и, что особенно важно, восполняемы. Кроме «живой» биомассы, потенциальный источник растительного сырья – большое количество отходов от переработки растений, производящихся в деревообрабатывающей промышленности, сельском хозяйстве. Так же как и нефть с газом, растительная биомасса может служить и сырьём для энергетики, и сырьём для химического синтеза.

Для крупномасштабного вовлечения растительной биомассы в энергетику и химический синтез необходимы эффективные способы её конверсии в доступное сырьё, в том числе в сахара, органические кислоты, и др. Таким эффективным способом может стать

ферментативный гидролиз, который, благодаря мягким условиям процесса, позволяет получать простые органические вещества, пригодные для дальнейшей химической, и, что особенно ценно, микробиологической трансформации. Наиболее труден гидролиз целлюлозы, составляющей большую часть растительных остатков, в связи с чем использование целлюлолитических ферментных комплексов, и их дальнейшее усовершенствование имеет важное значение для переработки растительного сырья.

Основной вклад в гидролиз целлюлозы в природе вносят ферменты эукариотических микроорганизмов – мицелиальных грибов, они же наиболее активно используются и в биотехнологической конверсии целлюлозы. Эукариотические ферменты устроены гораздо сложнее прокариотических. На каталитическую активность, помимо аминокислот активного центра, и других аминокислот, влияющих на стабильность фермента и его взаимодействие с субстратом, влияют ещё и полисахаридные компоненты – гликаны, связанные с аминокислотными остатками фермента. Степень гликозилирования и структура гликанов у эукариотических ферментов, в том числе целлюлолитических, чрезвычайно разнообразны. Современные представления о механизмах работы целлюлолитических ферментов весьма неполны, что не позволяет полноценно моделировать их работу, и разрабатывать более совершенные формы ферментов.

Таким образом, тема диссертации является актуальной как для решения фундаментальных задач (изучение механизмов работы ферментов), так и для прикладных исследований (усовершенствование биотехнологий конверсии целлюлозы).

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертации

Достоверность результатов работы Доценко А.С. основана на применении современных, надёжных и воспроизводимых методов изменения структуры исследуемых ферментов, на полном и тщательном анализе структуры и активности мутантных ферментов, грамотном сравнении свойств мутантных ферментов как с нативным немутантным ферментом из *Penicillium verruculosum*, так и с рекомбинантным немутантным ферментом, гетерологично экспрессируемым в *Penicillium canescens*. Использование нескольких субстратов для анализа активности каждого из трёх исследованных ферментов, и хорошая корреляция этих данных между собой также подтверждает достоверность окончательных выводов об улучшении активности мутантных ферментов.

На основании проведённой исследовательской работы автором сделано шесть выводов. Все выводы обоснованы и базируются на большом экспериментальном материале, и отражают результаты работы. В качестве замечания к выводам можно сказать, что выводы 2 и 3 целесообразнее было бы объединить. Формулировка вывода 2 является техническим описанием начального этапа диссертационной работы, в отличие от остальных выводов, где изложено именно осмысление технических результатов работы.

Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

Установление структуры N-связанных гликанов целлюлаз мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, выявление последствий удаления таких гликанов из фермента безусловно имеет научную ценность, в связи с сегодняшними фрагментарными представлениями о механизмах работы ферментов, особенно эукариотических. Полученные автором данные вносят вклад в сбор первичных данных о соотношении структуры ферментов и их функций, и эти данные важны для дальнейшего развития математического моделирования работы ферментов.

С практической точки зрения, автором получены достоверные и заметные увеличения осаживающей активности исходных целлюлаз из *Penicillium verruculosum*, установлены оптимальные составы смесей таких ферментов для осаживания конкретного субстрата – измельчённой древесины осины. Очевидно, что использованный автором подход перспективен для улучшения активности целлюлаз, используемых в промышленности. В качестве замечания можно сказать, что в обсуждении этих практических результатов не уделено внимание сравнению с активностями мировых аналогов (например, из *Trichoderma*), используемых в промышленности. Во введении автор подчёркивает, что «*полученные результаты имеют большое значение для разработки нового поколения мутантных штаммов – продуцентов высокоактивных целлюлаз на основе грибов рода Penicillium*». Тем не менее, без сравнения уровней активности трудно оценить, являются ли результаты диссертации заделом для реального конструирования практически значимых продуцентов, или скорее указывают перспективное направление для создания такого задела в будущем.

Содержание диссертации

Диссертационная работа Доценко А.С. построена по традиционному плану, изложена на 166 страницах, состоит из Введения, Обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, Заключение, выводов, списка цитированной литературы, включающего 214 источников, а также приложения с данными масс-спектрометрии и анализа сайтов N-гликозилирования. В целом диссертация носит завершённый характер, очень хорошо проиллюстрирована (содержит 64 рисунка и 21 таблицу).

Во введении обоснована актуальность и научно-практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования, подчёркнута научная новизна результатов, дана краткая сводка методов работы. В качестве замечания к рассуждениям об обосновании значимости работы можно высказать следующее. Имела ли в виду автор, говоря, что «*запасы растительной биомассы значительно превосходят запасы ископаемых энергоносителей*», всю имеющуюся ныне биомассу? С точки зрения биосферного баланса, очевидно, что

вовлечение хоть сколько-нибудь серьёзного процента имеющейся биомассы в биотехнологический гидролиз может вызвать малопредсказуемые последствия для биосферы. При обсуждении «видов» человечества на растительную биомассу нужно обсуждать и предполагаемые её количества, которые реально вовлечь в производство. С практической точки зрения важно, насколько эти количества сравнимы с потреблением ископаемых источников энергии. Утверждение автора, что *«переработка растительной биомассы не вызывает загрязнение окружающей среды и изменение климата»* также очень спорно. При этом не вызывает сомнений актуальность и значимость биотехнологической переработки растительного сырья для получения топлива и сырья для химического синтеза.

В Обзоре литературы автор подробно рассматривает характеристики растительного сырья, проблемы его биотехнологической переработки, проблемы белковой инженерии целлюлаз, и особенности целлюлолитического комплекса *Penicillium verruculosum*. Обзор литературы свидетельствует о том, что автор хорошо ориентируется в проблеме, проанализировал большое количество современной научно-технической информации, способен на критический анализ и обобщения. Замечания к обзору литературы заключаются в следующем.

Справедливо утверждая, что *«белковая инженерия позволяет менять свойства уже известных ферментов, на порядок или несколько порядков увеличивая активность и операционную стабильность»*, автор не приводит примеров такого значительного увеличения активности именно для целлюлаз из грибов или других эукариотических клеток. При этом, в источниках, на которые автор ссылается в этом случае (ссылки 85 – 87), также не приводится таких примеров.

В обзоре не хватает сравнения конкретных цифр, характеризующих ферменты. На протяжении обстоятельного обсуждения влияния структур ферментов и их мутаций на активности, автор везде употребляет сравнительные характеристики «больше-меньше», «выше-ниже», «сдвинута в ту или иную область», не приводя ни одной таблицы сравнения практически значимых показателей ферментов. В связи с этим возникает вопрос, касающийся практической значимости результатов диссертации: какой вклад в коммерчески значимые свойства ферментного препарата вносит именно каталитическая активность фермента? Или, говоря иначе, насколько надо повысить именно активность, чтобы это заметно отразилось на стоимости получаемого с помощью этого ФП продукта?

В главе «Материалы и методы» содержится детальное описание всех методик, использованных в диссертации, что позволяет оценить достоверность результатов, и воспроизвести эти методики другим исследователям.

Глава «Результаты и их обсуждение» содержит подробное и хорошо иллюстрированное изложение хода работ, полученных результатов, и оценки достоверности

и значимости результатов. В качестве замечаний к Результатам можно отметить следующие моменты.

Судя по данным, приведённым в таблицах, рекомбинантные ферменты из *Penicillium canescens* содержат несколько другие гликаны, чем нативные ферменты из *Penicillium verruculosum*. Например, в таблице 4 приведено, что нативная ЭГП содержит гликаны (Man)₄₋₈ (GlcNAc)₂ в сайте N42, а рекомбинантные варианты ЭГП N19A и ЭГП N194A содержат в этом сайте гликаны (Man)₂₋₉ (GlcNAc)₂. В этой и аналогичных таблицах, описывающих ферменты ЦБГ, имеются и другие подобные расхождения. Хотелось бы, чтобы автор прокомментировала значимость таких изменений для сравнения свойств мутантных и немутантных ферментов.

Для всех трёх ферментов были определены активности по отношению к п-нитрофенольным производным моно- и олигосахаридов. Из обзора литературы можно понять, что ферменты ЭГП и ЦБГП из *Penicillium verruculosum* не способны катализировать гидролиз п-нитрофенольных производных целлобиозы и лактозы. Автор не поясняет, для чего это делалось, и какое значение имеют полученные результаты.

Опубликование результатов диссертации

Результаты и выводы диссертационной работы Доценко А.С. представлены в печатных работах – двух статьях, опубликованных в хороших иностранных журналах (Biotechnology and Bioengineering, и Protein Engineering, Design and Selection), и двух статьях, опубликованных в отечественных журналах (Хранение и переработка сельхозсырья, и Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия). Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях.

Содержание автореферата

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Анны Сергеевны Доценко «Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования целлюлаз мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*» содержит достоверные и обоснованные результаты, отличающиеся научной новизной, актуальностью, и научно-практической значимостью. Работа отвечает всем требованиям п.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённых Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата химических наук, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Старший научный сотрудник
Кандидат биологических наук

Лавров К.В.

09.11.2016

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов" (ГосНИИ генетика)

117545, г. Москва, 1-й Дорожный пр., д. 1,

Тел.: +7 (495) 315-01-83,

e-mail: lavrov.ko@gmail.com

