

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертационную работы Денисенко Юрия Андреевича на тему «Белковая инженерия грибных ксиланаз 10-й семьи гликозидгидролаз», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Денисенко Ю.А. посвящена изучению трех эндо-1,4-β-ксиланаз: ксиланаз А и Е *Penicillium canescens* и ксиланазы III *Trichoderma reesei* и получению их мутантных форм с улучшенными операционными параметрами методами белковой инженерии, а именно получение мутантных форм с увеличенной температурной стабильностью и форм, устойчивых к белковым ингибиторам типа Xylanase Inhibiting Protein (XIP) из злаков. Ксиланазы гидролизуют гликозидные связи основной цепи ксилана - полисахарида, который состоит из остатков D-ксилозы и присутствует в клеточной стенке растений. При этом образуются короткие олигосахариды и сильно снижается степень полимеризации полисахарида. Интерес к созданию мутантных форм данных ферментов обусловлен, как минимум, двумя причинами. С фундаментальной точки зрения большой интерес представляет изучение аминокислотных взаимодействий и определение структурных факторов, ответственных за термостабильность и устойчивость к ингибированию белковыми ингибиторами данных ксиланаз. С практической точки зрения, важность проведения исследований такого рода объясняется их активным использованием в биотехнологических процессах, в основном, в качестве премикса при производстве комбикормов для сельскохозяйственных животных и птиц, а также в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности.

Диссертация Денисенко Ю.А. построена по стандартному принципу и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, экспериментальную часть результаты и их обсуждения, вывод и список литературы. Содержание диссертации полностью соответствует специальностям «биохимия» и «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Во введении кратко описана актуальность проведения данного исследования, научная новизна и практическая значимость, а также цели и задачи диссертационной работы. В обзоре литературы подробно описаны строение и разнообразие ксиланов, присутствующих в клеточной стенке растений, а также состав ксиланолитической системы ферментов, необходимый для эффективного гидролиза ксиланов. Описаны направления биотехнологического применения данных ферментов. Значительная часть литературного обзора посвящена разбору современных работ и исследований, направленных на улучшение операционных параметров ксиланаз. Обзор литературы

непосредственным образом связан с темой диссертации, он помогает читателю лучше понять выбор направления исследований и его актуальность.

В главе «Материалы и методы» изложены методики, используемые Денисенко Ю.А. в диссертационной работе. Следует отметить, схема получения грибных ферментов с измененной аминокислотной последовательностью является довольно сложной, однако благодаря последовательному изложению применяемых методик, создается ясность о схеме проведения эксперимента с целью получения мутантных форм ксиланаз. Изучение основного параметра для данной работы - температурной стабильности - проводилось двумя независимыми методами: по изучению остаточной активности при инкубации ферментов и с помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Также в данной главе описан метод определения устойчивости ксиланаз к белковым ингибиторам из ржаной муки.

Глава «Результаты и их обсуждение» начинается с выбора аминокислотных замен, которые теоретически могли бы привести увеличению термостабильности трех ксиланаз. Для этого автор использовал несколько подходов: компьютерное моделирование и выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых ферментов с последовательностями более термостабильных ксиланаз. Для увеличения термостабильности ксиланаз было предложено провести ряд одинарных замен, двойные замены и делеции на N-конце аминокислотной последовательности ксиланазы А. Большая часть выбранных замен была направлена на создание дополнительных ионных взаимодействий в белковой глобуле, также были замены, направленные на увеличение плотности гидрофобных взаимодействий и на увеличение жесткости третичной структуры за счет введения остатка пролина в начало α -спирали.

Для выяснения факторов, влияющих на устойчивость некоторых ксиланаз к белковым ингибиторам типа ХІР из злаковых растений автор проводил аминокислотное выравнивание, а также сравнивал трехмерные структуры исследуемых ксиланаз и структуру ингибируемой ксиланазы в комплексе с ингибитором. Предположение о том, что вставка из 5 аминокислотных остатков является фактором, придающим устойчивость некоторым ксиланазам к ингибитору, выглядит логичным и аргументированным.

В Главе 8 диссертационной работы представлены непосредственные результаты работы. Автором проведена большая работа по получению и выделению рекомбинантных мутантных форм ксиланаз в гомогенном виде. Одна аминокислотная замена – замена лейцина на фенилаланин в 18 положении привела к увеличению термостабильности ксиланазы А. Таким образом, было подтверждено предположение, что заполнение полости более объемным неполярным остатком фенилаланина приводит к увеличению

температурной стабильности фермента. Значительное увеличение термостабильности ксиланазы E наблюдалось у двух мутантных форм, направленных на создание дополнительного ионного взаимодействия. Очевидно, что введение тирозина вместо аргинина в положении 134 приводит к увеличению термостабильности. Показано, что введение пролина в положении 196 в ксиланазе E для увеличения жесткости третичной структуры приводит к незначительной стабилизации фермента.

Исследование устойчивости к белковым ингибиторам из злаков показало, что мутантные формы ксиланазы A и ксиланазы III со вставкой дополнительных 5 аминокислотных остатков в равной степени снижают вязкости нативного и термоинаktivированного экстрактов ржи за время реакции, в отличие от рекомбинантных форм дикого типа. По мнению автора, введение вставки из 5 аминокислотных остатков приводит к удлинению соответствующей пептидной петли, формирующей «стенку ущелья» активного центра и создает стерические затруднения для связывания белкового ингибитора типа XIP из ржаной муки с ксиланазой.

Все указанные выше результаты являются оригинальными и отражают новизну данной работы. Работа представляет собой целостное и завершенное научное исследование, выполненной на очень высоком экспериментальном уровне. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными.

Замечания к диссертационной работе.

В описании актуальности диссертационной работы Денисенко Ю.А. неясно обоснована необходимость улучшения свойств (термостабильности и устойчивости к ингибитору типа XIP) именно указанных ксиланаз (XylA и XylE из *Penicillium canescens*, и Xyl3 из *Trichoderma reesei*). На сегодняшний день известны и термостабильные ксиланазы, и ксиланазы, устойчивые к XIP ингибиторам, которые, из общих соображений, и можно использовать на практике для улучшения эффективности гидролиза гемицеллюлоз.

При описании свойств мутантных вариантов ксиланаз, обладающих увеличенной термостабильностью, недостаточно проанализированы причины снижения активности этих вариантов. Является ли это снижение особенностью конкретных аминокислотных замен, рассчитанных автором с помощью моделирования *in silico*, или это обычный эффект большинства мутаций, повышающих термостабильность ферментов?

Не проанализирован практический эффект от повышения термостабильности, сопровождаемого снижением уровня каталитической активности. Будет ли повышена эффективность гидролиза гемицеллюлоз такими ферментами, в сравнении с ферментами дикого типа?

Недостаточно практически обоснована методика проверки термостабильности ксиланаз при температурах не выше 55 – 60°C. Известно, например, что одна из стадий производства комбикормов (для использования в которых, в том числе, предназначены ксиланазы), грануляция, проходит при 80°C, и ферменты должны сохранять в этих условиях свою активность.

В Выводах (или в тексте Результатов) было бы интересно указать не только конкретные результаты экспериментальной работы (которые указаны предельно чётко и полно), но и возможные гипотезы о структуре и функциях ксиланаз, которые могли получить подтверждение в ходе анализа мутантных форм. Настоящая диссертация, хотя и является практически ориентированной, тем не менее выстроена как фундаментальная научная работа, ценностью которой являются научные обобщения.

Вместе с тем, указанные недочеты никоим образом не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают общего высокого уровня работы.

Содержание диссертации Денисенко Ю.А. соответствует паспорту специальностей 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (химические науки), а также критериям, определяемым пп. 2.1-2.5 «Положения о присуждении ученых степеней Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова и оформлено согласно Приложениям № 5, 6 «Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова»

Таким образом, соискатель Денисенко Юрий Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник ФБГУ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика с.н.с., к.б.н. Лавров Константин Валерьевич

Специальность, по которой оппонентом защищена диссертация: 03.02.07 - генетика

Контактные данные:

адрес: 117545, Москва, 1-ый Дорожный пр., 1
телефон: +7(495)315-01-83
e-mail: Lavrov.ko@gmail.com

Подпись с.н.с., к.б.н К.В. Лаврова заверяю.

Начальник службы управления персоналом ФБГУ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика

Г.Н. Давыдова

3 декабря 2018 г

