ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу 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 Ю.А. Денисенко посвящена получению мутантных форм ксиланаз с улучшенной температурной стабильностью методами белковой инженерии. Также была проведена работа по получению форм ксиланаз, которые демонстрируют устойчивость к белковым ингибиторам из злаков. В качестве объектов исследования были выбраны три ксиланазы из 10-й семьи гликозидгидролаз из мицелиальных грибов: эндо-1,4-β-ксиланазы А и Е *Penicillium canescens* и эндо-1,4-β-ксиланаза 3 *Trichoderma reesei*. Актуальность и практическая значимость данной работы подтверждается тем, что ферментные препараты, содержащие эндо-ксиланазы, нашли широкое применение в целлюлозно-бумажной промышленности, производстве биоэтанола, хлебопечении и в качестве компонента кормов для домашней птицы и животных. Температурная стабильность ферментов является решающим факторов в некоторых биотехнологических процессах. В частности, для применения в кормовой промышленности, ксиланазы должны сохранять свою активность на стадии пеллетизации и быть устойчивыми к белковым ингибиторам, которые содержаться в злаках. В связи с вышесказанным, улучшение биотехнологических свойств, таких как каталитическая активность, температурная стабильность, высокая активность в широком диапазоне значений pH, устойчивость к ингибиторам имеет высокое практическое значение.

В данной работе проведено получение генов ксиланаз с измененной нуклеотидной последовательностью, молекулярное клонирование в штамм-реципиент, культивирование штаммов и последующее хроматографическое разделение культуральных жидкостей и выделение рекомбинантных форм ксиланаз в гомогенном виде. Были определены их биохимические параметры и температурная стабильность методами измерения остаточной активности

фермента после инкубации и методом ДСК. Рекомбинантные формы изучаемых ксиланаз дикого типа и две мутантные формы с дополнительными пятью аминокислотными остатками были изучены на предмет устойчивости к белковым ингибиторам Xylanase Inhibiting Protein из ржаной муки. Для этого использовали метод, основанный на определении изменении вязкости экстрактов ржи, содержащих активные и инактивированные ингибиторы, под действием гомогенных рекомбинантных форм ксиланаз.

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Во «Введении» автор подробно объясняет актуальность темы исследования, формулирует цели и задачи работы, излагает научную и практическую значимость проведенной работы, а также представляет положения, выносимые на защиту. В «Литературном обзоре» описывается строение ксиланов, биохимические свойства и функциональность эндо-1,4-β-ксиланаз, применение ксиланазных ферментных препаратов и современные биотехнологические способы улучшения операционных параметров ксиланаз, в основном, способы увеличения температурной стабильности ферментов методами белковой инженерии.

В разделе «Материалы и методы» приведен список реактивов, субстратов, микроорганизмов и ферментных препаратов, использованных в ходе исследования. Также представлено подробное описание всех проведенных экспериментов и экспериментальных методик. Экспрессия рекомбинантных форм ксиланаз проводилась в грибных штаммах-реципиентах, что включает длительные и сложные манипуляции при клонировании и культивировании. В данной диссертационной работе были использованы следующие современные подходы: физико-химические, биохимические, микробиологические подходы, а также методы компьютерного моделирования структуры белков, выравнивания аминокислотных последовательностей ферментов, генной инженерии, секвенирования ДНК, молекулярного клонирования, белковой хроматографии,

масс-спектрометрического анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии.

Раздел «Результаты и их обсуждение» можно разделить на три большие части. В первой части автор объясняет выбор аминокислотных замен, которые потенциально должны привести к увеличению термостабильности ксиланаз, а также предполагает, какие структурные факторы у некоторых ксиланаз ответственны за наличие свойства резистентности к белковым ингибиторам, содержащимся в злаках. Во второй части описываются результаты последовательных стадий получения мутантных форм ксиланаз. В третьей части раздела «Результаты и их обсуждение» приводятся биохимические параметры гомогенных рекомбинантных мутантных форм и рекомбинантных форм дикого типа. В качестве основных результатов диссертационной работы, можно выделить следующие:

1. Получена мутантная форма ксиланазы А *Penicillium canescens* с одинарной аминокислотной заменой L18F с увеличенной температурной стабильностью, по сравнению с рекомбинантной формой дикого типа.
2. Получены мутантные формы ксиланазы Е *Penicillium canescens* с аминокислотными заменами Y134R; Y134R/D248E; T196P, которые обладают увеличенной температурной стабильностью, по сравнению с рекомбинантной формой дикого типа.
3. Показано, что ксиланаза А *Penicillium canescens* и ксиланаза 3 *Trichoderma reesei* подвергаются ингибированию при наличие в экстракте ржи активных форм белковых ингибиторов. Ксиланаза Е *Penicillium canescens*, при этом, проявляет свойство резистентности к данному ингибитору.
4. Получены мутантные формы ксиланазы А *Penicillium canescens* и ксиланазы 3 *Trichoderma reesei* с удлиненной петлей в районе активного центра (на 5 аминокислотных остатков), которые в значительно меньшей степени подвергаются воздействию белковых ингибиторов из ржаной муки.

Работа изложена на 138 страницах, содержит 15 таблиц и 48 рисунков. Список литературы включает 211 ссылок. Необходимо отметить, что диссертационная работа написана понятным научным языком, хорошо оформлена, текст сопровождается наглядными таблицами и рисунками, что выгодно дополняет диссертацию и способствует более осмысленному пониманию диссертации.

Основные результаты работы Денисенко Ю.А. отражены в тексте диссертации и автореферате. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе 5 публикаций в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus.

По прочтении текста диссертационной работы возникают следующие вопросы и замечания:

1. В разделе 5.2.7 сказано «Белок, содержащийся в супернатанте, высаливали сульфатом аммония.» Однако не указано, какая концентрация (количество) сульфата аммония использовалось.

2. Как правило, для краткого обозначения додецилсульфата натрия используется SDS, а не Ds-Na.

3. Использование сокращений а.о. и а.к. не является оправданным и вносит некоторую путаницу, поскольку в ряде случаев они используются в качестве прилагательных.

Вышесказанные замечания являются частными и никоим образом не влияют на результаты и выводы диссертационной работы.

Диссертация Ю.А. Денисенко представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование в области белковой инженерии, биохимии и биотехнологии, обладает актуальностью и содержит новые результаты, имеющие большое теоретическое и прикладное значение.

Содержание диссертации Денисенко Ю.А. соответствует паспортам 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 достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент,
доктор химических наук,
руководитель лаборатории
Клеточной биологии рецепторов

ПЕТРЕНКО АЛЕКСАНДР ГЕОРГИЕВИЧ 03.12.2018

Специальность, по которой оппонентом защищена диссертация: 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Контактные данные:
адрес: 117997 Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.
телефон: +7(495)335-41-77
e-mail: petrenkoag@gmail.com

Подпись Петренко А.Г. заверяю:

ЗАПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
Уч. ИБХ РАН