

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Шашкова Игоря Александровича «Создание ферментных препаратов нового поколения на основе мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* для применения в кормопроизводстве», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06. – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Разработка новых, высокоактивных ферментных препаратов, способных эффективно расщеплять некрахмальные полисахариды (НПС) злаков, является одной из наиболее приоритетных задач в современном кормопроизводстве.

Добавление таких ферментных препаратов в корма, в которых преобладают такие полисахариды, используемые при кормлении сельскохозяйственных животных, в частности поросят и цыплят-бройлеров, позволяет значительно снизить расход корма, увеличить суточный прирост животных, а также улучшить их физиологическое состояние. Данная работа посвящена созданию новых, высокопродуктивных рекомбинантных штаммов на основе мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* 537, продуцентов ферментного комплекса карбогидраз который способен с высокой эффективностью расщепляет НПС злаков. Таким образом, актуальность представленной работы несомненна.

Рецензируемая работа построена традиционно и содержит введение (с.5-10), обзор литературы (с.11-42), описание материалов и методов исследования (с.43-56), изложения полученных результатов и их обсуждение (с.57-119), выводы (с.119-121), список цитируемой литературы, включающий 201 ссылку (с.-137). В работу включены также 4 приложения и список используемых сокращений. Диссертация изложена на 137 страницах печатного текста, включает 31 рисунок и 46 таблиц.

Во введении к диссертации автор четко изложил задачи проведенного исследования, его особенности и полученные практические результаты.

Содержание обзора литературы составляет рассмотрение особенностей карбогидраз, их применение в составе кормовых добавок, микроорганизмы, которые продуцируют карбогидразы, пути оптимизации процесса культивирования микроорганизмов, позволяющие наиболее эффективно получать требуемые ферменты. Следует отметить, что обзор литературы написан весьма обстоятельно, а используемые в нем литературные источники охватывают преимущественно последние десятилетия. В списке литературы достаточное количество зарубежных источников

Привлекает внимание глава, касающаяся материалов и методов исследования. В ней детально описаны использовавшиеся в работе ферментные препараты, субстраты, питательные среды (всего 8), другие реагенты. Кроме обширного числа биохимических и биотехнологических методов, автор в своих выводах опирался на результаты вполне современных физических и физико-химических методов исследования – высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии, масс-спектрометрического анализа, распылительную сушку. Диссертационная работа включает подробное описание использованных методик, для обработки

экспериментальных данных использованы методы математической статистики. Таким образом, приведенные в работе результаты исследований являются абсолютно достоверными.

Основное содержание экспериментальной части работы и обсуждения полученных результатов составляет разработка рекомбинантных штаммов *Penicillium verruculosum* и ферментных препаратов на их основе.

В том числе в этом направлении исследованы амплификация генов целевых ферментов, создание генетических конструкций для трансформации реципиентного штамма *Penicillium verruculosum*, трансформация штамма-реципиента *Penicillium verruculosum*, селекция активных рекомбинантных штаммов.

Определенное внимание в работе уделено технологическим характеристикам разработанных штаммов, в частности, исследование стабильности продуцирования целевых ферментов рекомбинантными штаммами серии *Penicillium verruculosum* EX, культивирование штаммов-продуцентов серии *Penicillium verruculosum* EX в лабораторных условиях. В частности был проведен сравнительный анализ активности и компонентного состава ферментных препаратов штаммов *Penicillium verruculosum* EX13 и EX35 и штамма-реципиента *Penicillium verruculosum* 537, а также свойств рекомбинантных ферментных препаратов.

Определенное внимание в работе было уделено выбору вида микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) для процесса культивирования штаммов *Penicillium verruculosum* EX13 и EX35. В этом разделе работы рассмотрено влияние степени кристалличности разных видов МКЦ, реакционная способность различных видов МКЦ при ферментативном гидролизе, состава и концентрации сахаров, экстрагируемых из МКЦ в водной среде.

Все вышеизложенное отражает значительную научную новизну проведенного исследования.

Большой раздел работы посвящен подготовке разработке технологических проблем практического использования разработанных ферментных препаратов. Так, показана возможность замены при культивировании штаммов *Penicillium verruculosum* EX13 и EX35 импортной МКЦ на отечественные экспериментальные аналоги без потери и/или с увеличением продуктивности целевых ферментов.

В процессе оптимизации состава стандартной питательной среды в лабораторных ферментёрах было продемонстрировано, что замена дрожжевого экстракта на кукурузный экстракт и мочевины, кристаллической глюкозы – на глюкозную патоку, а также изменение pH ферментационной среды с 4,75 до 5,25, приводит в случае штамма *Penicillium verruculosum* EX13 к увеличению продуктивности по КМЦ-азной и ксиланазной активности на в 1,3 и 1,9 раза соответственно; в случае штамма *Penicillium verruculosum* EX35 – к увеличению продуктивности по ксиланазной активности в 1,2 раза.

Модифицированная питательная среда была рекомендована для применения в промышленном производстве ферментных препаратов в условиях завода ООО «Агрофермент». На этом заводе успешно проведены испытания штаммов *Penicillium verruculosum* EX13 и EX35 в производственных условиях, проведены промышленные ферментации и наработаны партии гранулированных ферментных препаратов Агроксил

Премиум (ЕХ13) и Агроксил Плюс (ЕХ35). Наконец, успешно проведены испытания новых ферментных препаратов Агроксил Премиум и Агроксил Плюс в качестве кормовой добавки при кормлении растущих поросят и цыплят-бройлеров. Это указывает на значительную практическую значимость работы.

Характеризуя работу в целом, можно отметить, что диссертация И.А.Шашкова является завершенной научно-квалификационной работой, обладающей внутренним единством, в которой, на основании выполненных систематических исследований разработаны теоретические положения о закономерностях получения новых ферментных препаратов и показана возможность практического применения полученных данных.

Оппонент не имеет существенных замечаний по основным положениям работы. Можно только отметить слишком большое количество сокращений, части из которых можно было избежать. В работе имеется ряд опечаток.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в части «Области исследования» п.1, 2, 3, 7, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертация и автореферат оформлены согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова."

Официальный оппонент:

Заведующий Кафедрой биоматериалов

ФГБОУ ВО Российского химико-технологического университета

им. Д.И. Менделеева, доктор химических наук, профессор

03.12.18

Штильман Михаил Исаакович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Адрес: 125047, г. Москва, Миусская площадь, д.9
Телефон: 8-910-409-04-37. e-mail: shtilmanm@yandex.ru

Подпись профессора М.И. Штильмана

удостоверяю

Ученый секретарь РХТУ им. Д.И. Менделеева

канд.техн.наук



Н.К. Калинина