ОТЗЫВ

официального рецензента Хакимжанова Айдара Атымтаевича на диссертационную работу Смекенова Изата Темиргалиевича

«Клонирование и оптимизация экспрессии генов целлюлаз в промышленных штаммах *Saccharomyces cerevisiae*»,

представленную на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «6D070100 - Биотехнология»

1. Актуальность темы исследования и ее связь с общенаучными и общегосударственными программами

На сегодняшний день этанол является наиболее перспективным и экологически чистым жидким биотопливом. Использование биоэтанола в качестве топлива даже в смеси с бензином значительно уменьшает загрязнение окружающей среды за счет снижения объема выбросов газа CO_2, вызывающего парниковый эффект. Растительная биомасса, представленная в виде лигноцеллюлозы, является самым распространённым, дешевым и возобновляемым ресурсом, в отличии от используемых на сегодняшний день сельскохозяйственных культур (кукуруза, сахарнаый тростник и свекла). К тому же, в Казахстане перспективным и весьма изобилующим сырьем для производства биоэтанола является солома и отходы переработки зерна, так как крахмало- и сахаросодержащие материалы повышают стоимость конечного продукта биотехнологического производства – этанола. Однако микроорганизмы, способные сбраживать целлюлозосодержащее сырьё и ферментировать образующиеся сахара в этанол не встречаются в природе. Они могут быть созданы только искусственным путем с помощью генно-инженерных методов клонирования генов.

На основании вышеизложенного, считаю, что тема диссертационной работы Смекенова И.Т. актуальна, поскольку направлена на решение крупной научно-технологической проблемы нынешнего времени, связанной с созданием рекомбинантных промышленных штаммов дрожжей, способных эффективно гидролизовать целлюлозу и, что очень важно, одновременно ферментировать образующиеся сахара. Применение этих штаммов позволяет осуществлять вместо двухэтапного (гидролиз полимеров + ферментирование сахаров) непрерывный и экономически более эффективный одностадийный технологический процесс переработки растительного сырья в этанол.

Следует отметить, что диссертационная работа Смекенова И.Т. выполнена в рамках научных проектов 0144/ГФ «Создание рекомбинантных штаммов микроорганизмов, эффективно экспрессирующие гены целлюлаз для получения биотоплива из целлюлозсодержащего сырья» и 1324/ГФ «Разработка технологии получения биоэтанола из целлюлозного сырья с помощью генетически модифицированных промышленных штаммов дрожжей» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

2. Научные результаты и их обоснованность

Научные результаты диссертации Смекенова И.Т. полностью отвечают требованиям «Правил присуждения ученых степеней». Полученные экспериментальные данные очень информативно и ясно отображены на многочисленных рисунках, таблицах и схемах, что подтверждает высокую доказательную базу.

Результаты исследовательской работы соответствуют поставленным задачам и вполне обоснованы. Присутствует логическая взаимосвязь между результатами поэтапного исследования. В ходе выполнения работы были получены следующие основные результаты:

- проведен сравнительный анализ экспрессии гена эндо-1,4-β-глюканазы гриба *Aspergillius niger* в эписомальных и интегральных экспрессионных векторных системах;

- созданы промышленные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с геном *tabgl1* гриба *Thermoascus aurantiacus* и дана оценка их способности сбраживать целлобиозу в этанол. Дополнительно выявлено, что гликозилирование секретируемого TaBGL1 зависит от генетического фона штаммов дрожжей и в значительной степени от источников углерода, присутствующих в среде культивирования (глюкоза или целлобиоза). Показано, что созданные рекомбинантные штаммы проявляют устойчивость к различным концентрациям этанола, фурфурола и H_2O_2, а также к высоким температурам;

- создан промышленный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, коэкспрессирующий β-глюкозидазу гриба *Thermoascus aurantiacus* и мембранный переносчик целлодекстринов гриба *Neurospora crassa*, определена способность полученного рекомбинантного штамма сбраживать целлобиозу в этанол;

- исследовано производство этанола промышленным штаммом *Saccharomyces cerevisiae*, коэкспрессирующим гены целлюлаз 1,4-β-глюкозидазы гриба *T. aurantiacus*, эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger* и экзо-1,4-β-глюконаз гриба *L. edodes*.

Полученные автором данные подвергнуты тщательному анализу, хорошо проинтерпретированы с имеющимися литературными и ранее полученными собственными результатами.

3. Степень обоснованности и достоверности каждого научного результата (научного положения), выводы и заключения соискателя, сформулированных в диссертации

Приведенные научные результаты диссертационной работы обладают достаточной достоверностью. Они подтверждены соответствующими экспериментальными данными и качественно проиллюстрированы на графиках, электрофореграммах, таблицах и схемах, приведенных в диссертации. В работе использован широкий арсенал современных методов молекулярной биологии и биохимии, адекватных решаемым вопросам. Результаты исследования обоснованы и аргументированы широким

фактическим материалом, а логически выстроенные задания исследования решались диссертантом поэтапно и были направлены на достижение поставленной конечной цели. В выводах кратко и четко представлены сформулированные результаты в соответствии с поставленными задачами исследования.

4. Степень новизны каждого научного результата (положения), выводы соискателя, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе впервые созданы рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae* ATCC 24860-TaBgl1, YB-2625-TaBgl1, Y-1528-TaBgl1, Y-2034-TaBgl1, Y-2034/*tabgl1• cdt1-egfp,* Y-2034-TaBgl1/*eng1•cel6B•cel7A* с использованием сконструированных интегральных векторов для встраивания в *HO* локус и δ-последовательности хромосом дрожжей с генами 1,4-β-глюкозидазы (*tabgl1*) гриба *T. aurantiacus,* мембранного переносчика целлодекстринов (*cdt1*) гриба *N. crassa,* эндо-1,4-β-глюканазы гриба *A. niger*, двумя генами экзо-1,4-β-глюканазы гриба *L. edodes* (*cel7A* и *cel6B*).

Определены промышленно значимые характеристики для разработанных штаммов. Установлено, что от используемых штаммов дрожжей и источников углерода зависит важное свойство фермента - степень гликозилирования секретируемого TaBGL1. Показана способность рекомбинантных штаммов расти в среде с целлобиозой в качестве единственного источника углеводородов и способность конвертировать целлобиозу в этанол, а также способность рекомбинантного штамма Y-2034-TaBgl1/*eng1•cel6B•cel7A* производить этанол из целлюлазных субстратов (авицел и предобработанная солома).

Каждый научный результат обладает научной новизной и выносится на публичную защиту впервые.

5. Практическая и теоретическая значимость научных результатов

Практическая значимость научных результатов диссертационной работы заключается в экспериментальной разработке и создании рекомбинантных промышленных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, способных экспрессировать грибные целлюлазные гены, перспективности их использования в производстве этанола из возобновляемых и дешевых источников растительной биомассы - лигноцеллюлозы.

Теоретическая значимость научных результатов заключается в выявлении закономерностей экспрессии генов термостабильных грибных целлюлаз в дрожжевых системах и анализе влияния экспрессионных систем, генотипа штаммов и источников углерода на биохимические характеристики ферментов – pH и температурный оптимумы, термостабильность, весьма важных для технологического процесса получения биоэтанола. Особо следует отметить интересные данные, полученные по гликозилированию и секреции целлюлаз, а также устойчивости рекомбинантных штаммов *S. Cerevisiae* к ряду стрессовых факторов – повышенной температуре и осмосу, воздействию фурфурола, уксусной кислоты, H_2O_2 и этанола.

6. Замечания, предложения по диссертации

В целом отмечая все достоинства работы, хотелось бы обратить внимание на некоторые имеющиеся, на мой взгляд, недостатки.

1. В разделе «Обзор литературы» не совсем сбалансированными по объему представляются некоторые подразделы. Так, чрезмерно много информации по биологии, размножению и генетическому разнобразию дрожжей (пункт 1.2). Конечно, это все важно для выбора промышленного штамма, процессов трансформации и культивирования, однако следует отметить, что диссертация посвящена не только данным вопросам. На этом фоне, роль и характеристика целлюлолитических ферментов описаны гораздо меньше (пункт 1.3), хотя конечные (преследуемые в работе) параметры этого энзимного комплекса у создаваемых штаммов дрожжей – центральная задача диссертации. Еще меньше информации в литературном обзоре относительно мембранного переносчика целлодекстринов (пункт 1.4), между тем роль этого белка в транспорте и конверсии промежуточных олигосахаридов в технологической цепочке производства этанола принципиально важна.

2. Не совсем ясно, по какой причине для переноса генов целлюлаз в качестве доноров были выбраны именно использованные в диссертации микроорганизмы.

3. Да, действительно ферменты β-1,4-глюканазы (целлюлазы) отсутствуют у дрожжей, но β-глюкозидаза (КФ 3.2.1.21) согласно некоторым источникам имеется. Однако в диссертационной работе об эндогенном (дрожжевом) ферменте не упоминалось и, соответственно, его участие в гидролизе целлодекстринов или целлобиозы и образовании β-глюкозы к сожалению не учитывалось.

4. При изучении особенностей гликозилирования и ферментативного дегликозилирования рекомбинантных эндо-β-1,4-глюканазы и β-1,4-глюкозидазы возможно целессообразно было бы использование специфического окрашивания ПАГ после электрофореза на гликопротеины Шифф-перйодатным методом.

5. В разделе «Результаты и их обсуждение» (пункт 3.2.6) в тексте, на рис. 31 и подрисуночной подписи название вещества фурфурол написано неверно, а именно, как фурфурал.

Приведенные выше замечания и недостатки не снижают достоинств работы, в основном они носят дискуссионный характер, а технические погрешности в оформлении работы легко устранимы.

7. Соответствие содержания диссертации в рамках требований Правил присуждения ученых степеней

Диссертационная работа соответствует всем требованиям «Правил присуждения ученых степеней». В ней соблюдены принципы самостоятельности и внутреннего единства, а также присутствуют научная новизна и практическая ценность работы. При выполнении диссертационной работы докторант использовал современные методы молекулярной биологии,

генной инженерии, биохимии и микробиологии, что подтверждают достоверность полученных результатов. Основные научные результаты диссертации на соискание степени доктора философии (PhD), доктора по профилю опубликованы в 22 печатных работах, в том числе 2 статьях и 2 тезисах в журналах с ненулевым импакт-фактором, входящих в базу данных Web of Science или Scopus.

На основании всего вышеизложенного, считаю, что диссертационную работу докторанта Смекенова И.Т. на тему «Клонирование и оптимизация экспрессии генов целлюлаз в промышленных штаммах *Saccharomyces cerevisiae*», можно рекомендовать к публичной защите по специальности «6D070100 – Биотехнология».

Рецензент:
Заведующий лабораторией
биохимии зерновых культур, к.б.н.
РГП «Институт молекулярной
биологии и биохимии им.
М.А. Айтхожина» КН МОН РК Хакимжанов А.А.

Подпись заверяю,
инспектор по кадрам
Джумабаева А.С.

КАДР БӨЛІМІ

«14» 02 2020 г.