

LABORATOIRE STABILITE GENETIQUE ET ONCOGENESE (UMR 8200 CNRS)

Villejuif France, December 15, 2019

ОТЗЫВ

научного консультанта на диссертацию PhD-докторанта Сmekенова Изата на тему: «Клонирование и оптимизация экспрессии генов целлюлаз в промышленных штаммах *Saccharomyces cerevisiae*», представленную на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по специальности 6D070100 - Биотехнология

Диссертационная работа посвящена клонированию и оптимизации экспрессии генов целлюлаз в промышленных штаммах *Saccharomyces cerevisiae*. На сегодня, жидкие биотоплива производятся в ферментационных процессах, в которых участвуют микробные биокатализаторы, такие как дрожжи или бактерии, превращая сахара в спирты. Однако, дрожжи *S. cerevisiae* оказались более надежными, чем бактерии, относительно толерантности к конечному продукту этанолу и другим соединениям, присутствующих в гидролизатах. Кроме этого, дрожжи *S. cerevisiae* входят в список организмов «Безопасные в обращении» (GRAS, generally recognized as safe). Хотя, природные дрожжи *S. cerevisiae* не содержат гены 1,4-β-гликозил-гидролаз, следовательно, они не способны ферментировать целлюлозу, содержащуюся в клеточных стенках растений. Но из-за высокой способности сбрасывать глюкозу до этанола и выдерживать высокое содержание этанола в среде, дрожжи *S. cerevisiae* являются самым подходящим кандидатом для биоконверсии целлюлозосодержащей биомассы в биотопливо. Хотя процесс производства этанола из сахаров или крахмала продовольственных культур является высокоэффективным, целлюлозная биомасса (сухое растительное вещество) имеет большую ресурсную базу, чем кукуруза, пшеница или сахарный тростник.

Производство биотоплива биотехнологическим путем становится важным альтернативным возобновляемым топливным ресурсом из-за ее низкой стоимости и изобилия растительной биомассы, ссылаясь конкретно на лигноцеллюлозную биомассу. А низкая стоимость этанола может составить ценовую конкуренцию нефтепродуктам, к тому же использование растительной биомассы вместо источников продовольственных культур, позволит снизить нехватку продовольствия и помочь голодающей части населения Земли. Так как предварительная обработка лигноцеллюлозной биомассы генерирует широкий спектр соединений, ингибирующих процессы ферментации и гидролиза, необходимо использовать микроорганизмы, обладающие устойчивостью к данным соединениям, следовательно, для превращения полученных из биомассы сахаров в этанол важно выбрать штаммы дрожжей с промышленным фоном и высокой устойчивостью к ингибиторам. Эти природно-устойчивые штаммы могут служить платформой для конструирования рекомбинантных штаммов, способных использовать целлюлозу в качестве источника углерода для производства этанола.

В связи с этим считаю, что данная тема диссертационной работы по созданию рекомбинантных промышленных штаммов с генами целлюлаз является актуальной и представляет большое научное и практическое значение.

Известно, что для создания рекомбинантных штаммов в качестве экспрессирующих векторов использовались эписомальные вектора. Однако, данные вектора являются многокопийными автономными YEr векторами клетки дрожжей, которые могут содержать

до 40 копий плазмид на клетку, вызывая непрерывную экспрессию большого количества чужеродных генов в *S. cerevisiae*, что может привести к истощению энергетических ресурсов и нарушению метаболизма клетки. Кроме этого, данный тип плазмид обычно трудно стабильно поддерживать в клетках и, как правило, с относительно высокой частотой утрачиваются клетками, особенно при отсутствии селективного давления. К тому же с практической точки зрения для стабильной экспрессии белка, а также для предотвращения потери рекомбинантного гена в отсутствие селективного фактора, более подходящим является использование интегральных векторов, обеспечивающих внедрение генов в хромосому дрожжей.

Смекенов И.Т. впервые сконструировал интегральные вектора для интеграции в *HO* локус и δ -последовательности хромосом дрожжей, содержащие гены экзо-1,4- β -глюканаз, эндо-1,4- β -глюканазы, 1,4- β -глюкозидазы и мембранного переносчика целлодекстринов, для эффективного сбраживания целлюлозы в этанол. Он также впервые показал, что степень гликозилирования секретируемого TaBGL1 зависит от используемых штаммов дрожжей и в значительной степени зависит от источников углерода (целлюлоза или глюкоза). Изучил промышленные штаммы дрожжей, которые показали высокую осмотолерантность и устойчивость к различным концентрациям этанола, фурфурола и H_2O_2 , а также к высоким температурам. Им также впервые создан новый стабильный штамм дрожжей с генами целлюлитических ферментов интегрированными в хромосомы дрожжей, способный расти в синтетической среде, содержащий авицел, предобработанную солому или карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) в качестве единственного источника углерода. Показал, что рекомбинантный штамм производил 5,62 г/л этанола (22% от теоретического максимального выхода) при использовании 5% авицел в качестве субстрата, тогда как из 5% предобработанной соломы пшеницы производил 1.43 г/л этанола (14% от теоретического максимального выхода).

Данная работа является сложной, поскольку требует сконструировать множество интегральных векторов с несколькими генами целлюлаз и изучить целлюлазные ферменты, проанализировать выход этанола из различных источников углерода. Несмотря на это, автор смог решить все поставленные задачи и достичь поставленной цели исследования благодаря хорошей логистике и правильно разработанному плану. В целом работа хорошо изложена и вызывает интерес. Данные результаты подтверждают заслуженное право Смекенова И.Т. получить докторскую степень PhD, так как он выполнил свой научный проект с отличными результатами и показал, что обладает необходимыми теоретическими знаниями и владеет в совершенстве основными методами работы в областях генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии.

В дополнение, что важно отметить, диссертационная работа имеет огромное теоретическое и практическое значения, которые отражены в 22 опубликованных печатных работах, в том числе 2 статьи и 2 тезиса в журналах с ненулевым импакт-фактором входящих в базу данных Web of Science а также Scopus, 6 статей в республиканских научных изданиях, рекомендуемых ККСОН МОН РК, и 12 тезисов в материалах международных конференций. Дополнительно, на основании результатов диссертационной работы был получен 1 патент РК на полезную модель №2017/0230.2 «Интегративный плазмидный вектор для экспрессии генов в дрожжах».

Считаю, что рассматриваемая диссертационная работа соответствует всем требованиям для PhD докторской диссертации на соискание ученой степени доктора философии (PhD). Данная диссертация полностью готова для защиты.

Научный консультант:
PhD, профессор института
Густава Русси (Вильжюиф, Франция)

STABILITE GENETIQUE ET ONCOGENESE
UMR 8200 CNRS
INSTITUT DE CANCEROLOGIE GUSTAVE ROUSSY
Pavillon de Recherche 2
39 rue Camille Desmoulins
94805 VILLEJUIF cedex
Tél. : 01.42.11.5118/4235
Fax : 01.42.11.5244/ Сапарбаев М.К.