ОТЗЫВ официального оппонента

диссертационной работы Синельникова Игоря Геннадьевича на тему «Функциональная и биохимическая характеристика хитиназы растения *Drosera capensis*», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Синельникова Игоря Геннадьевича является классической поисковой работой, посвященной исследованию свойств нового фермента – хитиназы 19-ого семейства гликозил-гидролаз из хищного растения *D.capensis* и возможности его применения в качестве нового биологического средства защиты растений.

Актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений. Использование химических фунгицидов снижает биоразнообразие почв и ведет к снижению урожайности. Разработка новых фунгицидных агентов, основанных на живых организмах или ферментах, способных дополнить или заменить существующие средства защиты является важной задачей современной биотехнологии в сельском хозяйстве.

Таким образом, актуальность диссертационной работы Синельникова И.Г. «Функциональная и биохимическая характеристика хитиназы растения *Drosera capensis*» не вызывает сомнений и поставленные в ней цели и задачи являются значимыми в сфере биотехнологии и сельского хозяйства.

При этом круг **практически** важных задач, на решение которых направлена диссертация Синельникова И.Г. довольно широк. К ним относятся: поиск и клонирование нового фермента, оптимизация экспрессионной системы *E.coli*, модификация поверхности исследуемой хитиназы для повышения его растворимости, получение высокопродуктивного штамма продуцента *Pichia pastoris* и комплексный анализ фунгицидных свойств против основных патогенов злаковых.

Структура диссертации включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список используемых литературных источников.

Материал диссертации изложен на 116 страницах текста, автор ссылается на 205 литературных источников, работа иллюстрирована 44 рисунками и содержит 22 таблицы.

Во введении диссертант обосновывает цель исследований, формулирует задачи, характеризует научную новизну, теоретическую и практическую значимость, приводит положения, выносимые на защиту. Диссертация содержит подробный литературный обзор, содержащий информацию о патогенах растений и методах борьбы с ними, а также классификацию известных хитиназ и их роли в иммунитете растений. Литературный обзор подкреплен ссылками на актуальные научные статьи. Таким образом, представленный обзор свидетельствует об отличном знании литературы в предметной области и умении критически анализировать имеющиеся результаты.

В разделе «Материалы и методы» приведено описание проведенных диссертантом исследований. Логически они разбиты на три раздела: 1) Молекулярно - генетические методы для клонирования генов, получения генетических конструкций и внесения мутаций в генетические последовательности; 2) Методы оптимизации экспрессии в про- и эукариотах, а также рефолдинга рекомбинантной хитиназы; 3) Методы анализа физико-химических свойств и фунгицидных свойств полученных препаратов хитиназ.

Использованные автором методики представлены достаточно подробно и убеждают в достоверности полученных результатов. Разработанные методические подходы могут также быть полезны при воспроизведении в других лабораториях и решении подобных научных задач. Совокупность полученных экспериментальных результатов позволяет оценить работу Синельникова И.Г. как законченный научный труд с обоснованными выводами.

Среди полученных в диссертационной работе Синельникова И.Г. научных результатов, обладающих несомненной ***научной новизной и практической значимостью***, можно выделить следующие:

- применение метода рационального дизайна является хорошей стратегией для решения проблемы образования телец включения при экспрессии цистеин-богатых белков в *E.coli* и позволило получить растворимую форму рекомбинантной хитиназы (выход составил 50 мг/л культуральной жидкости).

- сравнение физико-химических свойств хитиназ 18 и 19 семьи гликозил - гидролаз показало, что хитиназы 18 семейства более эффективны для биоконверсии полимерных субстратов, тогда как 19 семейство имеет в 3-6 раз меньшую активность, однако имеют больший биотехнологический потенциал в качестве биофунгицида.

- обнаружено, что каталитическая активность по целевым субстратам, не является определяющим фактором эффективности хитиназ в качестве биологического средства защиты растений.

В целом работа написана хорошим языком и хорошо иллюстрирована, однако, к диссертации существуют следующие ***замечания и вопросы***:

1. В работе отсутствует анализ и технико-экономическая оценка возможности внедрения полученного препарата в качестве коммерчески доступного средства защиты растений. В каких областях и в каком объеме растительные хитиназы могут заменить химические фунгициды?

2. Растительные геномы обычно содержат множество вариантов генов, кодирующих различные изоформы хитинолитических ферментов. Чем обоснован выбор хитиназы типа I в качестве объекта исследования?

3. В Материалах и методах нет описания методологии анализа последовательностей гомологичных хитиназ, результаты которой представлены в п.5.4.2.

4. В разделе 5.6 «Результатов» отсутствует анализ фунгицидных свойств растворимой формы мутантной хитиназы, почему?

Несмотря на сделанные замечания и рекомендации, диссертационная работа Синельникова И.Г. оставляет хорошее впечатление и представляет завершенное исследование, выполненное на высоком научном и методическом уровне. Полученные данные и сделанные выводы важны как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

По материалам диссертации опубликовано 3 научные статьи в журналах индексируемых Web of Scince и Scopus, 4 тезиса докладов на научных конференциях и 1 патент на изобретение. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы Синельникова Игоря Геннадьевича «Функциональная и биохимическая характеристика хитиназы растения *Drosera capensis*» полностью отражают содержание диссертации.

Таким образом, по критериям актуальности, научной новизны и практической значимости представленная к защите диссертация «Функциональная и биохимическая характеристика хитиназы растения *Drosera capensis*» соответствует паспорту специальности 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» (пункты 1, 8, 9, 11 паспорта специальности)., а также требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова и оформлена согласно приложениям №5,6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. В диссертационной работе решена важная задача экспериментального обоснования применения ферментных препаратов хитиназ в качестве биологических средств защиты растений, имеющая существенное значение для соответствующей области знания (биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Синельников Игорь Геннадьевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

И.о. директора ФГБУ «Государственный научно-исследовательский

институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
(НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика)
(117545 Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1
www.genetika.ru, тел. 8(495) 315-37-47,
e-mail оппонента:yanenko@genetika.ru)
доктор биологических наук, профессор А.С. Яненко

Подпись Яненко А.С. заверяю
Ученый секретарь ФГБУ «Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
(НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика)
Кандидат биологических наук Т.А. Воейкова

09.12.2021 г.