

ОТЗЫВ

*на автореферат диссертации Савиновой Ольги Сергеевны
«Получение рекомбинантных миорных изоферментов лакказ базидиомицета
Trametes hirsuta 072 в *Penicillium canescens* и их сравнительная характеристика»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.04 – Биохимия*

Диссертационная работа Ольги Сергеевны Савиновой посвящена очень важному и актуальному направлению – производству ферментных препаратов. В настоящее время энзимологию охватил бум, постепенно стирающий границы между традиционными биологическими и химическими дисциплинами. Ферментативные реакции все шире используются в химическом синтезе лекарств, полимеров, пищевых добавок, и их возможности постоянно расширяются. Особенный интерес вызывают ферменты с широкой субстратной специфичностью, имеющие большой технологический потенциал. К ним относятся ферменты лакказы, характерные для грибов, специализирующихся на деструкции лигнина. Безусловно, интенсивное внедрение в технологию ферментов невозможно без развития генной инженерии, поскольку их природные источники не всегда оказываются эффективными промышленными продуцентами. К сожалению, мы сегодня являемся свидетелями споров о негативном влиянии трансгенеза на окружающую среду и здоровье людей. Эти споры носят чисто экономический характер и тормозят развитие биотехнологии. Поэтому, отрадно видеть работы в данном перспективном направлении, такие, как исследование Ольги Сергеевны.

Живые организмы, как правило, продуцируют не один фермент с заданной активностью, а несколько близких изоферментов. У них различаются свойства – субстратная специфичность, скорость реакции, температурный оптимум и т.д. Миорные изоферменты являются индуцильными, то есть выделяются не постоянно, а только в ответ на определенные стимулы. При этом исследования затрагивают, в первую очередь, мажорный фермент, являющийся сравнительно легкодоступным и удобным объектом. Научная новизна работы Ольги Сергеевны заключается в том, что она посвящена миорным изоферментам лакказы гриба трутовика жестковолосистого (*Trametes hirsuta* 072), эффективного деструктора лигнина, вызывающего белую гниль древесины лиственных пород.

Поскольку выращивать плесневые грибы намного быстрее, дешевле и эффективнее, чем трутовики, первым делом диссидент взялась за создание продуцента лакказ. Таким продуцентом стал гриб *Penicillium canescens*: другой потенциальный продуцент на основе штамма аспергилла дал заметно более низкие показатели. Для внедрения генов лакказ в плесневый гриб была проведена серьезная работа по выбору системы экспрессии, получению и отбору трансформантов. В результате были отобраны штаммы *P. canescens*, являющиеся наиболее активными продуцентами миорных лакказ *T. hirsuta*.

Но создание продуцентов – еще полдела. Ольга Сергеевна исследовала их культивирование и нашла стадии жизненного цикла, в которых наблюдается максимум экспрессии интересующих генов.

Безусловно, создание штаммов продуцентов само по себе является темой диссертации. Но Ольга Сергеевна не стала ставить точку и продолжила исследование самих миорных лакказ. Для этого она провела выделение белковой фракции классическими методами (высаливание) и ее разделение на индивидуальные белки при помощи хроматографии на различных сорбентах. В конечном итоге, диссидентом были разработаны индивидуальные приемы очистки для различных изоферментов. А получив изоферменты в чистом виде, Ольга

Сергеевна принялась за их исследование. Поскольку лакказы в активном центре содержат медь и окрашены, важное значение для понимания их свойств является изучение спектральных характеристик. Оказалось, что в процессе очистки некоторые изоферменты теряют медь и могут утрачивать активность. Затем, проведены исследования свойств выделенных индивидуальных изоферментов (молекулярная масса, изоэлектрическая точка, термостабильность, температурный и pH оптимум каждого). Этот комплекс исследований сам по себе является большой научной работой!

Разумеется, важнейшей задачей являлось изучение катализической активности выделенных изоферментов. По обесцвечиванию красителя азуре определялся их окислительно-восстановительный потенциал. Исследовалось окисление различных субстратов лакказ, являющихся фрагментами макромолекул лигнина – гвяякола, феруловой и синаповой кислот, пирокатехина, ванилина, орцина и нескольких других. Поскольку лакказы имеют широкую субстратную специфичность, докторант не ограничилась только перечисленными соединениями, но и проверила изоферменты на способность обезвреживать ксенобиотики (азокраситель конго красный, индигокармин, атразин и проч.). Исследование позволило обнаружить различия катализических свойств отдельных изоферментов. Помимо этого, для каждого изофермента подбирались перспективные медиаторы на основе комплексов железа и молибдена, усиливающие их катализическую активность.

При ознакомлении с докторской работой сразу бросается в глаза разносторонность автора. Ольга Сергеевна проявила себя как замечательный биохимик, владеющий множеством самых современных исследовательских методов. Она самостоятельно спланировала и осуществила значительный объем работ. Собранный материал может стать основой для создания уникальных ферментных препаратов. Обширный материалложен докторантом четко и лаконично, результаты представлены наглядно в виде таблиц. Ольга Сергеевна проявила себя зрелым исследователем, способным самостоятельно ставить и решать большие задачи. Остается пожелать ей дальнейших успехов в науке.

Учитывая актуальность темы, научную новизну и практическую значимость полученных результатов, адекватность использованных методик для достижения поставленной цели и задач, считаю, что докторская работа Савиновой Ольги Сергеевны является существенным вкладом в развитие биохимии и соответствует требованиям п. 9 «Положения ВАК о порядке присуждения учёных степеней» к докторским на соискание учёной степени кандидата биологических наук. Автор является высококвалифицированным специалистом и заслуживает присуждения ему искомой степени по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Генеральный директор
ООО Интекстокс,
К.х.н.
E-mail mindubaev-az@yandex.ru
Тел. 89510603227
Специальность 02.00.03 Органическая химия



Миндубаев А.З.

25 04 2019 г