

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Савиновой Ольги Сергеевны «Получение рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072 в *Penicillium canescens* и их сравнительная характеристика», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия

**Актуальность темы.** Диссертационная работа Савиновой О. С. направлена на решение современной проблемы биохимии и биотехнологии - исследование ферментативного комплекса базидиальных грибов, получение новых, производственно ценных продуцентов ферментов и эффективное их использование для биокаталитической деструкции лигноцеллюлозной биомассы. Интерес к изучению ферментов микробного происхождения в значительной степени связан с тем, что применяемые для этой цели химические методы являются экологически неблагоприятными. Базидиальные грибы являются основными деструкторами лигноцеллюлозы в природе. Ключевыми ферментами их уникального секретизируемого комплекса являются лакказы (КФ 1.10.3.2), с помощью которых возможно осуществлять не только деструкцию лигноцеллюлозной биомассы, но и модифицировать различные фенольные соединения и ксенобиотики. Однако промышленное использование лакказ ограничено из-за отсутствия их высокоэффективных продуцентов. Физико-химические и каталитические свойства ферментов изучены недостаточно. Базидиальный гриб *Trametes hirsuta* 072 является эффективным деструктором лигнина. Его мультигенное семейство лакказ представлено семью генами (*lacA-lacG*), но только один изофермент изучен в достаточной степени (мажорный *LacA*). Функции и свойства остальных изоферментов неизвестны. Перспективным способом получения минорных изоферментов является их гетерологичная экспрессия. Исходя из вышеизложенного, актуальность диссертационного исследования Савиновой О. С. не вызывает сомнений.

**Цель** диссертационной работы соискателя состояла в получении и изучении свойств рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072.

**Научная новизна работы** очевидна. Автором впервые с помощью гетерологичной экспрессии в аскомицете *Penicillium canescens* получены три эффективных продуцента рекомбинантных минорных изоферментов лакказ (rLacC, rLacD и rLacF) базидиомицета *T. hirsuta* 072. Разработана схема выделения и очистки рекомбинантных изоферментов. Установлено, что наибольшей степенью гликозилирования (~23%) обладал изофермент rLacD, ИЭТ которого соответствовала рН 6,5 и температурный оптимум активности 75°C, что отличало указанный фермент от остальных. ИЭТ изофермента rLacC, напротив, находилась в наиболее кислой зоне рН 3,1. При 60°C изофермент rLacD проявлял наибольшую термостабильность ( $\tau_{1/2}=22\pm 2$  мин); rLacC — наименьшую ( $\tau_{1/2}=4\pm 2$  мин), скорость инактивации изоферментов LacA и LacF практически совпадала.

По наличию углеводных остатков в пептидах установлено присутствие таких уникальных сайтов гликозилирования, как Asn207 и Asn292 для rLacC и rLacD соответственно.

**Практическая значимость работы** заключается в том, что получены рекомбинантные минорные изоферменты лакказ; установлено, что применение минорных изоферментов rLacD и rLacF в составе ЛМС позволяет успешно обесцвечивать красители, что открывает перспективу их практического применения для обезвреживания отходов различных отраслей промышленности, содержащих токсичные соединения.

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа имеет традиционную структуру и включает: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение и список литературы (287 источников). Работа изложена на 156 страницах машинописного текста и содержит 22 таблицы, 27 рисунков, 3 приложения.



**Во введении** соискателем логично и достаточно полно обоснована актуальность темы диссертационной работы, четко сформулированы цель работы и задачи исследований, необходимых для её решения, приведены основные положения, выносимые на защиту, обозначена новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

В главе «**Обзор литературы**» представлен анализ научных источников по исследуемой проблеме. Автором умело и корректно обобщен опыт многочисленных исследований отечественных и зарубежных ученых по теме диссертационной работы. Приведенные сведения соответствуют современному состоянию вопроса. Раздел содержит информацию о разнообразии лакказ в природе, их структуре и функциях, свойствах и субстратной специфичности. Кроме того, в обзоре подробно рассмотрена роль грибных лакказ и возможность их биотехнологического применения, описаны различные системы для гетерологичной экспрессии целевых ферментов. Материал изложен в строгой логической последовательности и иллюстрирован таблицами и рисунками.

В разделе «**Материалы и методы**» достаточно полно изложены методики для выполнения исследований и сведения об использованных в работе материалах. Необходимо отметить широкий набор использованных автором классических и современных биохимических, биоинформатических, микробиологических методов и методов молекулярной биологии, что позволило диссертанту успешно решить поставленные задачи. Достоверность результатов не вызывает сомнений.

В разделе «**Результаты и их обсуждение**» автор представляет оригинальные экспериментальные результаты и их обсуждение. В первой части раздела описан выбор системы для экспрессии целевых минорных изоферментов лакказ по результатам сравнения активностей мажорного изофермента LacA, полученного в *Penicillium canescens* и *Aspergillus nidulans*, и обоснован выбор для осуществления поставленной цели работы системы на основе аскомицета *P. canescens*, как более эффективной.

Автором созданы штаммы-продуценты 6 минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 и проведен отбор наиболее активных трансформантов для дальнейшего исследования. Проведен качественный анализ транскрипции генов минорных гетерологичных лакказ по наличию ППР-продукта с кДНК. Для всех минорных лакказ было показано наличие РНК-продуктов. Уровень экспрессии генов, кодирующих изоферменты лакказ, был также изучен с помощью количественной ПЦР в реальном времени с применением геноспецифических праймеров. Показано, что данная экспрессионная система эффективна с точки зрения экспрессии целевых изоферментов (получение мРНК-копий). Учитывая, что уровни экспрессии не коррелировали с активностью соответствующего фермента (для изоферментов rLacB, rLacE, rLacG активность была очень низкая), диссертантом были проведены исследования по оптимизации условий культивирования продуцентов для увеличения активности целевых изоферментов. По результатам проведенных исследований штаммы *P. canescens* Cc1(25)25, *P. canescens* Dc2(6)23, *P. canescens* Fc3(5)27 были выбраны для выделения соответствующих изоферментов и исследования их свойств.

С помощью разработанной автором схемы выделения и очистки минорных изоферментов были получены изоферменты rLacD и rLacF, проведен их спектральный анализ и изучены физико-химические и каталитические свойства целевых ферментов.

Завершенность проведенных диссертантом исследований подтверждается тем, что автор показала практическую значимость работы, проведя исследование активности полученных изоферментов лакказ по отношению к деградации различных ксенобиотиков, в том числе четырех широко используемых красителей: конго красный (группа азокрасителей), индигокармин (индигоидная группа), бромфеноловый синий и феноловый красный (трифенилметановая группа). Так как лакказы в индивидуальном виде не всегда способны эффективно модифицировать ксенобиотики, были выбраны наиболее перспективные медиаторы: синтетические (АБТС и ГБТ), фенольные (ванилин, синаповая кислота, феруловая кислота) и



неорганические (октацианомолибдат калия,  $K_4Mo(CN)_8$  и ферроцианид калия,  $K_4Fe(CN)_6$ ). Установлено, что изоферменты rLacD и rLacF в составе лакказ-медиаторных систем эффективны для модификации труднодеградируемых красителей конго красного и фенолового красного.

Выводы по работе объективны, отражают результаты собственных исследований автора. Рецензируемая диссертационная работа имеет как научную, так и практическую значимость.

Материалы диссертационной работы широко апробированы на 8 международных и российских конференциях и конгрессах. По материалам экспериментальных исследований автором опубликованы 4 научные статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ.

Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы Савиновой О.С. полностью отражают содержание диссертации.

Высоко оценивая диссертационную работу Савиновой О.С., следует отметить, что она не лишена некоторых недостатков, которые не имеют принципиального значения и носят рекомендательный характер:

1. Следовало бы привести данные по изучению локализации исследуемых лакказ.
2. Не ясно, чем руководствовался автор при выборе столь большого числа повторяющихся операций, разрабатывая схемы выделения и очистки минорных изоферментов лакказ (рисунок 17, 18).
3. Указывая положения, выносимые на защиту, следовало бы конкретно указать значения показателей рН, температуры, термостабильности ферментов. Выражения «наиболее узкий», «наиболее кислый» и т.п. — некорректны. То же самое можно отметить и для выводов №3, 4.
4. Предположения автора о том, что вероятной причиной пониженной термостабильности изофермента rLacC и повышенной термостабильности изофермента rLacD (а также его высокого температурного оптимума активности) по сравнению с остальными

изоферментами могут служить различия в гликозилировании молекул изоферментов, не достаточно подтверждены экспериментально.

### Заключение

Диссертационная работа Савиновой Ольги Сергеевны представляет собой завершённое научное исследование и отвечает всем требованиям, предъявляемым к квалификационным работам. Материалы, изложенные в диссертации, соответствуют области исследований паспорта специальности 03.01.04 – Биохимия.

На основании вышеизложенного и с учетом новизны, теоретической и практической значимости считаю, что диссертационная работа на тему: «Получение рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072 в *Penicillium canescens* и их сравнительная характеристика» полностью отвечает требованиям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Правительством РФ от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями на 01 октября 2018 года), а ее автор Савинова Ольга Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

#### Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,  
проректор по научной  
и инновационной деятельности  
ФГБОУ ВО  
«Воронежский государственный  
университет инженерных технологий»



Корнеева Ольга Сергеевна



394036, Россия, г. Воронеж, проспект Революции, д. 19,  
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный  
университет инженерных технологий».  
Тел.: 8-910-343-6201  
E-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

