

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»  
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина  
Российской академии наук**  
– обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН  
**(ИБФМ РАН)**

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.5  
Тел./факс (4967)73-39-62, тел.(495)956-33-70, e-mail: adm@ibpm.ru  
<http://www.ibpm.ru>

11.04.2019 № 191-2-11-25

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

“ УТВЕРЖДАЮ ”

Исполняющий обязанности  
директора ИБФМ им. Г.К. Скрыбина  
РАН – обособленного подразделения  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
«Федеральный исследовательский  
центр «Пушкинский научный центр  
биологических исследований  
Российской академии наук»,  
д.б.н. А.А. Леонтьевский



А.А. Леонтьевский

« 11 » апреля 2019 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Диссертационная работа Савиновой О.С. посвящена получению рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072 в аскомицете *Penicillium canescens*, а также проведению комплексной характеристики целевых изоферментов и сравнительному анализу их свойств.

В условиях перехода к «зеленым технологиям», потребности в различных ферментах (в том числе в лакказах), способных осуществлять модификацию компонентов лигноцеллюлозного сырья сильно возросли. Интерес к лакказам обуславливается простыми требованиями к условиям катализа и отсутствием побочных продуктов, что

характеризует применение этих ферментов как наиболее перспективную альтернативу химическому окислению. Кроме того, лакказы привлекают внимание исследователей своей широкой субстратной специфичностью и достаточно высокой стабильностью, что обуславливает их способность к модификации не только лигнина и его производных, но и различных ксенобиотиков.

**Актуальность исследования Савиновой О.С. не вызывает сомнений**, так как представляемая диссертационная работа посвящена решению важной задачи – получению и характеристике свойств новых, ранее не изученных, минорных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072 – эффективного деструктора лигнина. На сегодняшний день лакказы признаны идеальными биокатализаторами и востребованы в различных отраслях промышленности: целлюлозно-бумажной (для отбеливания целлюлозы), текстильной (для отбеливания волокон и улучшения свойств ткани), пищевой (в качестве стабилизаторов и для деградации токсинов), фармацевтической (в синтезе биологически активных соединений) и др. Однако в настоящее время промышленное применение этих ферментов ограничивается отсутствием их высокоактивных продуцентов, а также недостатком знаний об их свойствах. Особенно это касается минорных изоферментов, которые обычно невозможно получить с помощью нативных продуцентов. При этом выбор подходящей системы для успешного получения целевого изофермента является нетривиальной задачей. Таким образом, получение новых изоферментов лакказ и изучение их свойств позволяет не только расширить представления об их функциях в организме, что имеет большое значение для фундаментальных исследований, но и создает возможность выбора конкретных изоферментов для целевого применения в разных отраслях промышленности, что имеет большую практическую значимость.

**Научная новизна** диссертационной работы состоит в том, что 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. Эти рекомбинантные изоферменты впервые выделены, очищены и охарактеризованы. Определены температурные и pH-оптимумы активности минорных изоферментов и их термостабильность, изучены спектральные и каталитические свойства изоферментов, а также их субстратная специфичность. В работе впервые проведен комплексный сравнительный анализ свойств минорных изоферментов со свойствами мажорного изофермента LacA и выявлены их сходства и отличия. Обнаружено, что минорные изоферменты rLacD и rLacF проявляют бóльшую эффективность при деградации красителей конго красного и фенолового красного в составе лакказа-медиаторных систем (ЛМС), чем мажорный LacA, что делает эти изоферменты потенциально перспективными для применения в биотехнологии.



Таким образом, **научная новизна диссертационной работы Савиновой О.С. не вызывает сомнений.**

**Практическая значимость** представляемой работы заключается в том, что изучение свойств новых изоферментов создает базу для создания ферментных препаратов на основе изоферментов лакказ для целевого применения в разных отраслях промышленности. Проведенная в настоящей работе оценка потенциала использования полученных минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 для обезвреживания отходов различных отраслей промышленности, содержащих токсичные соединения (на примере красителей), показала, что применение минорных изоферментов rLacD и rLacF в составе ЛМС позволяет успешно обесцвечивать красители. Следует отметить, что в случае обесцвечивания красителей конго красного и фенолового красного результаты, полученные с применением rLacD и rLacF, превосходят результат, полученный с применением мажорного изофермента LacA. Кроме того, изофермент rLacD имеет наиболее высокую термостабильность среди изученных представителей данного семейства, что может послужить преимуществом при практическом использовании этого изофермента. Таким образом, полученные результаты имеют несомненную **практическую значимость.**

Сформулированные в диссертации выводы подтверждены результатами экспериментальных исследований, проведенными в соответствии с опубликованными и разработанными методиками. В работе использованы современные методы анализа данных.

**Структура диссертации** является традиционной. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список цитируемой литературы и приложения. Библиографический указатель содержит 287 источников литературы, включающий современные публикации отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста и содержит 22 таблицы, 27 рисунков, 3 приложения.

Во «Введении» обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, приведены основные положения, выносимые на защиту, обозначены новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Сведения, приведенные в разделе «Обзор литературы» соответствуют современному состоянию вопроса. Раздел включает в себя информацию о разнообразии лакказ, их структурах и функциях в различных источниках, об их свойствах и субстратной специфичности. Кроме того в обзоре подробно рассмотрена физиологическая роль грибных лакказ и возможности 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» приведены сведения об использованных в работе материалах и подробно описаны методы исследования. Использование в работе современных биохимических, биоинформатических, микробиологических методов и методов молекулярной биологии позволяет считать, что **полученные результаты являются объективными, достоверными и не вызывают сомнений.**

В разделе «Результаты и их обсуждение» представлены оригинальные экспериментальные результаты и их обсуждение. Выбор системы для экспрессии целевых минорных изоферментов лакказ осуществлялся по результатам сравнения активности мажорного изофермента LacA, полученного в *Penicillium canescens* и *Aspergillus nidulans*. В результате более эффективной оказалась система на основе аскомицета *P. canescens*, которая была выбрана для осуществления поставленной цели работы.

Использованная схема клонирования генов *lacB-G* включала несколько этапов: получение ПЦР-фрагментов (геномных и кДНК копий) генов *lacB-G*; обработка полученных ПЦР-фрагментов специфичными эндонуклеазами; последующее клонирование ПЦР-фрагментов в экспрессионный вектор pPCGNX, расщепленный специфичными эндонуклеазами. Это позволило соединить ПЦР-фрагменты кодирующих областей генов лакказ с промотором гена *bgaS* β-галактозидазы без изменения нуклеотидной последовательности промоторной области гена *bgaS* и сигнального пептида генов лакказ.

Полученные плазмиды трансформировали в штамм *P. canescens* PCA-10(*niaD*). Наиболее активные трансформанты были отобраны для дальнейшего исследования. Для них был проведен качественный анализ транскрипции генов минорных гетерологичных лакказ по наличию ПЦР-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. Таким образом, было показано, что данная экспрессионная система эффективна с точки зрения экспрессии целевых изоферментов (получение мРНК-копий). Однако уровни экспрессии не коррелировали с активностью соответствующего фермента. Для изоферментов *gLacB*, *gLacE*, *gLacG* активность была очень низкая. Было проведено изучения возможных лимитирующих факторов (содержание  $\text{CuSO}_4$  в среде, pH среды, протеолитическая активность штаммов, оценка частоты использования кодонов у нативного продуцента и реципиента). По итогам 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.



В ходе очистки было показано, что использованная схема, ранее разработанная для выделения изофермента LacA, не является оптимальной для выделения изоферментов rLacD и rLacF. Поэтому она была оптимизирована, что позволило увеличить выход обоих ферментов и повысить удельную активность изофермента rLacD. Масс-спектрометрическая идентификация трех полученных белков подтвердила, что они представляют собой изоферменты rLacC, rLacD и rLacF соответственно.

Спектральный анализ изоферментов показал отличие спектров изоферментов, в особенности это касается изофермента rLacD, на спектре которого практически отсутствует пик в районе 610 нм. Также было показано, что молекулярные массы и изоэлектрические точки изоферментов отличались от предсказанных и между собой, что говорит о различной степени гликозилирования изоферментов (наибольшей степенью гликозилирования обладают изоферменты rLacF и rLacD). Экспериментально удалось установить наличие уникальных сайтов гликозилирования Asn<sup>207</sup> и Asn<sup>292</sup> для rLacC и rLacD соответственно.

Анализ физико-химических свойств изоферментов также показал различия в рН- и температурных оптимумах, а также термостабильности изоферментов, причиной которых, предположительно, могут служить найденные отличия в гликозилировании ферментов. Оценка окислительно-восстановительного потенциала изоферментов показала, что он уменьшается в ряду LacA>rLacF>rLacD>rLacC.

Оценка субстратной специфичности изоферментов показала следующие отличительные особенности: изофермент rLacC характеризуется низкой реакционной способностью по отношению к ароматическим аминам, а rLacD - сниженной способностью к окислению феруловой кислоты, а также неспособностью модифицировать *n*-кумаровую кислоту, которая является типичным субстратом для грибных лакказ. Однако сходство специфичности изоферментов LacA и rLacF было очевидно.

Оценка возможностей биотехнологического применения изоферментов лакказ на примере деградации красителей, показала, что изоферменты rLacD и rLacF в составе лакказа-медиаторных систем эффективны для модификации труднодеградируемых красителей конго красного и фенолового красного и в перспективе могут быть использованы для применения в биотехнологии.

Результаты исследования практически полностью отражены в научных публикациях (4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ) и апробированы на международных конференциях и конгрессах. Автореферат полностью соответствует требованиям и содержит основные результаты исследования и выводы.

**При ознакомлении с диссертационной работой Савиновой О.С. возникли следующие замечания:**

1. В разделе «Обзор литературы» не уделено достаточного внимания методам очистки различных изоферментов лакказ.
2. В разделе «Материалы и методы» следовало бы объединить в одну таблицу все олигонуклеотидные последовательности для проведения ПЦР, использованные в работе.
3. В разделе «Результаты и их обсуждение» не достаточно обсуждаются причины низкой активности рекомбинантных изоферментов rLacB, rLacE и rLacG.

Перечисленные замечания не снижают научной и практической ценности диссертационной работы, так как не носят принципиального характера.

Диссертационная работа Савиновой О.С. представлена обширным экспериментальным материалом и является завершенным научным исследованием. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов. Сформулированные выводы обоснованы и подтверждены результатами экспериментов в полном объеме.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа **Савиновой Ольги Сергеевны** является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в решение актуальных задач современной биохимии, а именно получение и сравнительное изучение свойств рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072.

Работа была заслушана и обсуждена, отзыв на диссертацию также был одобрен и одобрен на семинаре лаборатории микробной энзимологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (протокол №1/2019 от 11.03.2019 года).

Представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Правительством РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор, Савинова Ольга Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.



Отзыв на диссертационную работу Савиновой О.С. подготовлен старшим научным сотрудником лаборатории микробной энзимологии к.б.н. Лисовым Александром Викторовичем.

К.б.н., с.н.с., лаборатории микробной энзимологии ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленного подразделения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

 А.В. Лисов

«11» апреля 2019 г.

142290, Московская область, г. Пушкино, проспект Науки, д.5

Тел.: +7 (495) 625-74-48; 8 (4967) 73-05-00

Факс: +7 (495) 956-33-70

Электронная почта: leont@ibpm.pushchino.ru

Сайт: www.ibpm.ru

