

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.001 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от «30» мая 2019 г. № 16 о присуждении Савиновой
Ольге Сергеевне, гражданство Российская Федерация, ученой степени кандидата
биологических наук

Диссертация «Получение рекомбинантных минорных изоферментов лакказ
базидиомицета *Trametes hirsuta* 072 в *Penicillium canescens* и их сравнительная
характеристика» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 28 марта 2019 г.
(протокол №7) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального
государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, г.
Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Совет утвержден Федеральной службой по
надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007
г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России
от 13 февраля 2013 года № 74/нк, от 10 февраля 2014 года № 55/нк, от 30 сентября 2015
года №1166/нк и от 13 марта 2019 года № 222/нк.

Соискатель:

Савинова Ольга Сергеевна (1989 года рождения), с 2010 г. является сотрудником
Федерального государственного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха
Российской академии наук (с июля 2015 г. входит в состав Федерального
государственного учреждения «Федеральный исследовательской центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»). В июне 2011 г.
Ольга Сергеевна закончила Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Московский государственный университет пищевых
производств» с квалификацией инженер по специальности «Биотехнология» и в ноябре
2011 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного учреждения
науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, которую закончила
в 2015 г. по специальности «Биохимия». В настоящее время Савинова О.С. работает в
должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярных основ
биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного
учреждения «Федеральный исследовательской центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук».

Диссертационную работу соискатель Савинова О.С. выполняла в лаборатории
молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители:

Синицын Аркадий Пантелеймонович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук,

Тяжелова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории эволюционной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Корнеева Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное Бюджетное Образовательное Учреждение Высшего Образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий», проректор по научной и инновационной деятельности,

Лавров Константин Валерьевич, кандидат биологических наук, Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии

Выбор оппонентов обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, профессор Корнеева Ольга Сергеевна является одним из ведущих специалистов в области изучения биохимии ферментов грибного происхождения, их получения и очистки;

тем, что кандидат биологических наук, Лавров Константин Валерьевич известен как крупный специалист по гетерологичной экспрессии различных белков микроорганизмов и изучения особенностей их биосинтеза.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Савиновой О.С.

Ведущая организация:

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН)- обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН), в своем положительном отзыве, подписанным кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории микробной энзимологии ИБФМ РАН Лисовым А.В. и утвержденном исполняющим обязанности директора ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН Леонтьевским А.А., указала, что диссертационная работа Савиновой О.С. является самостоятельной научно-квалифицированной работой, которая полностью соответствует критериям,

установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Савинова Ольга Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН является признанным отечественным центром по исследованию белков, в том числе лакказ из различных источников. Лаборатория микробной энзимологии активно проводит изучение структур и свойств различных лакказ и располагает значительным опытом в работе с этими ферментами. Таким образом, сотрудники ИБФМ РАН и, в частности, указанной лаборатории, являются высококвалифицированными специалистами, проводящими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Савиновой О.С.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации:

Результаты, отражающие основной объем диссертационной работы Савиновой О.С. опубликованы в 4 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842:

1. Loginov D.S., Vavilova E.A., **Savinova O.S.**, Abyanova A.R., Chulkin A.M., Vasina D.V., Zherdev A.V., Koroleva O.V. Immunoassays of fungal laccases for screening of natural enzymes and control of recombinant enzyme production // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2014. V. 61. №2. P. 230-236.
2. **Savinova O.S.**, Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. Properties of two laccases of *Trametes hirsuta* 072 multigene family. Twins with different faces // *Biochimie.* 2017. V. 142. P. 183–190.
3. Moiseenko K.V., **Savinova O.S.**, Vasina D.V., Kononikhin A.S., Tyazhelova T.V., Fedorova T.V. Laccase Isoenzymes of *Trametes hirsuta* LE-BIN072: Degradation of Industrial Dyes and Secretion under the Different Induction Conditions // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2018. V.54, №9. P.834-841.
4. **Savinova O.S.**, Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Chulkin A.M., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. Evolutionary relationships between the laccase genes of Polyporales: Orthology-based classification of laccase isozymes and functional insight from *Trametes hirsuta* // *Frontiers in Microbiology.* 2019. 10:152. doi: 10.3389/fmicb.2019.00152

Результаты работы также были представлены на 4 отечественных и 4 зарубежных конференциях, конгрессах и форумах и опубликованы в сборниках материалов конференций:

1. **Савинова О.С.**, Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Беневоленский С.В., Королева О.В. Разработка подходов для увеличения продукции лакказы в рекомбинантном штамме *Penicillium canescens* // 7-й Международный научно-практический симпозиум «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов», 9-10 апреля 2014, Москва, Россия. С.13-16.

2. **Savinova O.S.**, Chulkin A.M., Tyazhelova T.V., Vavilova E.A., Benevolensky S.V., Koroleva O.V. Copper incorporation as a bottleneck in the biosynthesis of recombinant laccase // Dead Wood Meeting & Course 2016, 6-11 August 2016, Lammi, Finland.
3. **Савинова О.С.**, Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Васина Д.В., Тяжелова Т.В., Федорова Т.В., Беневоленский С.В., Королева О.В. Получение штаммов *Aspergillus nidulans* – продуцентов гетерологичной лакказы с повышенной активностью // X международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», 5-9 июня 2017, Минск, Республика Беларусь. С. 88-90.
4. **Savinova O.S.**, Moiseenko K.V., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: constitutive and inducible isozymes' transcriptional regulation and properties // 11-я международная конференция «Биокатализ-2017», 25-30 июня 2017, Московская область, Россия. С. 196-197.
5. **Савинова О.С.**, Васина Д.В., Сольев П.Н., Федорова Т.В., Тяжелова Т.В., Савинова Т.С. Оценка потенциала применения лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072 для биodeградации отходов производства фармацевтических препаратов на основе эстрогенов // VII Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды», 19-20 апреля 2018, Чебоксары, Россия. С. 74-75.
6. **Савинова О.С.**, Васина Д.В., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Рожкова А.М., Тяжелова Т.В., Сеницын А.П., Федорова Т.В. Использование *Penicillium canescens* в качестве системы для экспрессии изоферментов лакказ *Trametes hirsuta* // Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 23-25 мая 2018, Москва, Россия. С. 733-734.
7. Vasina D.V., **Savinova O.S.**, Chulkin A.M., Vavilova E.A., Moiseenko K.V., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. Heterologous expression of three minor laccases from *Trametes hirsuta* 072 and their properties // 43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS), 7-12 July 2018, Prague, Czech Republic, FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1). P. 173.
8. Zorov I.N., Rozhkova A.M., Dotsenko A.S., Bashirova A.V., Osipov D.O., Volkov P.V., **Savinova O.S.**, Sinitsyn A.P. Analytical methods for control of plant biomass enzymatic transformation // XVIII Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии – Сербские Леса», 23-29 сентября 2018, Белград, Сербия.
9. Rozhkova A.M., Dotsenko A.S., Zorov I.N., Bashirova A.V., Osipov D.O., Vakhrusheva A.B., Contreras F., Pramanik S., Dolatabadi M., **Savinova O.S.**, Sinitsyn A.P. Methods of creating effective enzyme complexes for utilizing of wood waste // XVIII Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии – Сербские Леса», 23-29 сентября 2018, Белград, Сербия.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках представленной диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора, проректора по научной и инновационной деятельности Федерального государственного Бюджетного Образовательного Учреждения Высшего Образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» **Корнеевой Ольги Сергеевны** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

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.

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории молекулярной биотехнологии Федерального Государственного Бюджетного Учреждения "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" **Лаврова Константина Валерьевича** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. В диссертации отсутствует раздел Выводы. Хотя фактически выводы полностью приведены в разделе Заключение, принято оформлять их в виде отдельного раздела.
2. В положениях, выносимых на защиту, (и, соответственно, в выводах) указано, что «Экспрессионная система на основе ... *P. canescens* является наиболее эффективной для гетерологичной экспрессии минорных изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072.». Это утверждение не является корректным с научной точки зрения, более правильным было бы утверждение «Экспрессионная система на основе ... *P. canescens* является наиболее эффективной *из апробированных авторами* для гетерологичной экспрессии минорных изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072.».
3. В выводе 2 отсутствует формулировка, приведённая во втором положении, выносимом на защиту, о сравнении свойств минорных лакказ с таковыми мажорного изофермента LacA.
4. В качестве незначительного замечания к списку опубликованных статей можно заметить, что не указано, что публикация в журнале Applied Biochemistry and Microbiology может являться также и публикацией в отечественных журналах Прикладная биохимия и микробиология или Биотехнология – в зависимости от того, куда авторы подавали исходный русский текст статьи.

Отзыв ведущей организации - Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН- обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (положительный). Отзыв содержит 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.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Ивченко Павла Васильевича, доктора химических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории №8 Металлоорганического катализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ордена Трудового Красного Знамени Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН (ИНХС РАН). Замечаний нет.

Миндубаева Антона Зуфаровича, кандидата химических наук, генерального директора ООО «Инновационные технологии детоксикации» (ИНТЕХТОКС). Замечаний нет.

Захаровой Елены Сергеевны, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева). Замечаний нет.

Шаховой Наталии Витальевны, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биохимии грибов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический Институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН). В качестве небольшого замечания отмечен неудачный термин «базидиальные лакказы» (на стр.9 и в выводе №4) для обозначения лакказ базидиальных грибов.

Шныревой Аллы Викторовны, доктора биологических наук, профессора кафедры микологии и альгологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет. В качестве незначительного замечания отмечено упоминание аскомицетного гриба *M. thermophila* (стр.21) без полного родового названия. При первом упоминании вида в тексте нужно предоставлять полное название с родовым названием и видовым эпитетом.

Абдуллатыпова Азата Вадимовича, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Института фундаментальных проблем биологии РАН, обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Пушкинский научный центр биологических исследований РАН". В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:

1. В работе применялся отбор трансформантов-продуцентов рекомбинантной лакказы по диаметру окрашенной зоны на среде с хромогенным субстратом ABTS. Это стандартный общепринятый метод, но сразу же возникает мысль о том, что далеко не все

продуценты лакказ, отобранные таким образом, будут активны в окислении их природных субстратов. Можно ли как-то модифицировать этот метод, используя в качестве субстрата полифепан, картон или опил тёмного цвета, и определять перспективных продуцентов лакказ по их способности окислять непосредственно лигнин?

2. Насколько перспективно применять лакказы в промышленности для обезвреживания стоков? Есть ли цифры в кубометрах стоков в год?

3. Не вполне ясно из автореферата, нужно пояснение: для чего проводится два этапа ионообменной хроматографии на носителях с одной и той же (диэтиламиноэтильной) функциональной группой?

4. Фенилсефароза - старый термин, и его можно писать не по-английски, а по-русски.

Голденковой-Павловой Ирины Васильевны, доктора биологических наук, руководителя группы функциональной геномики, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. В отзыве имеются следующие замечания и вопросы:

1. Желательно было бы привести общую информацию об использованном промоторе гена *bgaS*, как это сделано для промотора гена *gpdA* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) *A.nidulans*
2. Соискатель использовал сигнальные пептиды генов лакказ, однако не указано какую роль они могут играть в эффективной экспрессии белковых продуктов целевых генов
3. С чем связаны различия в активности штаммов (таблица 2), которые получены при трансформации одними и теми же плазмидами (например, *P.canescens* Cc1(25)5, *P.canescens* Cc1(25)24, *P.canescens* Cc1(25)25)? Каковы причины, по мнению соискателя, таких различий – копияность плазмид, эффективность транскрипции или другие причины?
4. Поскольку диссертантом использован один и тот же промотор (промотор гена *bgaS*) для контроля экспрессии целевых генов лакказ, возникает вопрос с чем может быть связан разный уровень их транскрипции (рис.6)?

В дискуссии принимали участие: Бовин Н.В., Звягильская Р.А., Капрельянц А.С., Левицкий Д.И., Вейко В.П., Шумянцева В.В.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие основные результаты:

1. Экспрессионная система на основе аскомицета *P. canescens* является наиболее эффективной для гетерологичной экспрессии изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072. С помощью методов генетической инженерии сконструированы плазмиды, несущие последовательности, кодирующие целевые изоферменты лакказ и созданы эффективные штаммы-продуценты трех рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072 (rLacC, rLacD и rLacF).
2. Рекомбинантные минорные изоферменты rLacC, rLacD и rLacF выделены в гомогенном виде и исследованы их свойства – молекулярные массы, ИЭТ, температурные и рН-профили активности, термостабильность, каталитические свойства, субстратная специфичность, ОВП.

3. Минорный изофермент rLacC обладает наиболее низким среди исследованных изоферментов ОВП, проявляет низкую реакционную способность по отношению к ароматическим аминам, обладает наименьшей термостабильностью, наиболее кислой ИЭТ, а также имеет более узкий диапазон оптимальных значений рН и температуры.
4. Минорный изофермент rLacD обладает наибольшей термостабильностью и наименее кислой ИЭТ по сравнению с остальными изоферментами. Кроме того, rLacD обладает пониженной способностью к окислению феруловой кислоты и не способен окислять *n*-кумаровую кислоту – типичные для базидиальных лакказ субстраты.
5. Минорный изофермент rLacF является наиболее близким по своим свойствам к мажорному LacA, однако обладает по сравнению с ним более низким ОВП.
6. Минорные члены лакказного семейства способны к деструкции красителей различных групп, причем изоферменты rLacD и rLacF в составе ЛМС эффективны для модификации труднодеградируемых красителей конго красного и фенолового красного и, в перспективе, могут быть использованы для применения в биотехнологии.

Теоретическая значимость исследования заключается во всестороннем изучении свойств трех ранее не охарактеризованных минорных рекомбинантных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072 - типичного представителя грибов-лигнолитиков. На сегодняшний день в литературе в основном представлены данные по свойствам мажорных изоферментов лакказ из различных источников. Представители минорных изоферментов охарактеризованы фрагментарно, либо вовсе не изучены из-за сложности их получения. Отсутствие полной характеристики всех членов мультигенных семейств лакказ затрудняет сравнение изоферментов между собой и, следовательно, не позволяет определить их роли в жизнедеятельности грибов.

Практическая значимость исследования состоит в том, что настоящее исследование может послужить базой 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 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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

