

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Моисеенко Константина Валерьевича**
«Лакказы и лигнинолитические пероксидазы дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*:
эволюция, транскрипция, секреция и участие в процессах биодеструкции»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4. Биохимия

Диссертационная работа Моисеенко Константина Валерьевича посвящена мультигенным семействам лакказ и лигнинолитических пероксидаз дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*. В работе исследуются особенности эволюционного формирования этих семейств и степень вовлеченности отдельных ферментов из каждого семейства в процессы биодеструкции лигнина и биодетоксификации сульфонфталеинового красителя бромкрезолового зеленого.

Актуальность темы диссертации.

Основным объектом исследования в представленной работе является базидиальный гриб *T. hirsuta* – типичный представитель группы дереворазрушающих грибов, вызывающих белую гниль древесины. *T. hirsuta* широко распространён в умеренной зоне Северного полушария и вместе с другими дереворазрушающими грибами играет ключевую роль в круговороте углерода лесных экосистем. Уникальность грибов белой гнили заключается в способности их ферментной системы катализировать реакции окислительной деполимеризации лигнина, что позволяет рассматривать эти грибы как естественную модель эффективного и устойчивого биотехнологического использования возобновляемых растительных биоресурсов. Также широкая субстратная специфичность упомянутой ферментной системы потенциально позволяет использовать отдельные её компоненты для детоксификации ряда широко распространённых загрязнителей окружающей среды.

В связи с вышесказанным тема диссертации Моисеенко Константина Валерьевича является актуальной как в фундаментальном отношении, так и в свете решения научных задач перехода к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству в рамках одно из приоритетных Направлений Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (утверждена Указом Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации»). Ценные биохимические экспериментальные данные могут стать отправной точкой для развития биотехнологических способов трансформации сложных органических соединений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертационной работе, обеспечивается необходимым анализом материалов и результатами аналитической обработки полученных данных. Выносимые на защиту 5 положений логично связаны с ходом решения поставленных задач. Раскрытие первого

положения конкретизирует и систематизирует гены лакказ и пероксидаз *T. hirsute* – типичного представителя грибов белой гнили. Второе положение поясняет эволюционные аспекты генов лакказ исследуемого дереворазрушающего гриба: они произошли в результате множественной дупликации предкового гена приблизительно во второй половине раннего Мелового периода. Третье положение постулирует надежный критерий для классификации лакказ и пероксидаз. Четвертое положение разделяет функции пероксидаз и лакказ *T. hirsuta*. Наконец, пятое положение отмечает факторы, оказывающие существенное влияние на процесс биохимической деградации лигнина ферментами *T. hirsuta*.

Диссертационная работа характеризуется хорошим логическим построением, эффективно подобранной совокупностью методов и подходов, а также высокой степенью литературной проработки решаемых вопросов. Все это свидетельствует о достаточной обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных автором диссертации, а также достоверности полученных результатов, которые полностью соответствуют цели и задачам исследования.

Личный вклад автора в решении поставленной научной проблемы обусловлен его непосредственным участием в подготовке, обработке и анализе объекта исследования с использованием биохимических, микробиологических, физико-химических, молекулярно-биологических, методов биоинформатики, а также статистической обработки данных. Диссертантом обобщены и проанализированы полученные результаты, сформулированы выводы, подготовлены соответствующие публикации в ведущих рецензируемых отечественных и зарубежных журналах биохимического профиля, проведена апробация работы на международных конференциях.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность научных положений и выводов подтверждена комплексностью исследования, выполненного с применением широкого спектра методических подходов. В работе использовано программное обеспечение, обеспечившее проведение биоинформатического и статистического анализов и построение соответствующих диаграмм и рисунков.

Научная новизна выполненного исследования связана с полученными результатами подробного эволюционного анализа формирования семейства генов лакказ и пероксидаз в грибах порядка Polyporales. Автором впервые предложена классификация изоферментов лакказ и пероксидаз на основе образуемых ими ортологических групп. Получены новые данные о составе экзопротеома гриба *T. hirsuta*, культивируемого в присутствии синтетического красителя и лигнина, измерены уровни транскрипции для всех генов лакказ и пероксидаз. Впервые проанализирован состав продуктов деградации ароматического биополимера грибом белой гнили, и полученные данные сопоставлены с таковыми по составу экзопротеома. Обо всем вышесказанном в полной мере свидетельствуют основные выводы диссертационной работы.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

В **научном плане** полученные результаты исследования позволяют установить индивидуальную роль грибных лакказ и пероксидаз в биодegradации ксенобиотиков и биотрансформации растительных субстратов. Так, для *T. hirsute* при деградации сульфонфталеинового красителя бромкрезолового зеленого основными секретлируемыми экзоферментами являются лакказы (LacA), а при деградации промышленного лигнина ряд пероксидаз – MnP5, VP2, MnP7 и MnP1.

В **практическом аспекте** материалы, полученные в ходе исследования формируют основу для направленного выбора изоферментов лакказ и пероксидаз, обладающих ценными для прикладных биохимических задач свойствами. Работа, безусловно, имеет перспективное значение с точки зрения валоризации лигнина, ценного биополимера, с использованием современных биотехнологических подходов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность.

Объем представляемой диссертации составляет 95 страниц печатного текста. Работа построена в классическом стиле, состоит из 5 страниц введения, 29 страниц обзора и анализа литературных источников, 11 страниц материалов и методов, 43 страниц результатов и их обсуждения, короткого заключения, выводов и списка используемых источников, насчитывающего 172 позиции.

Введение обосновывает актуальность работы, даёт общую оценку разработанности её темы, характеризует объект исследования, устанавливает цель и задачи работы, даёт оценку научной новизны, теоретической и практической значимости исследования, а также формулирует выносимые на защиту положения.

Обзор и анализа литературных источников в полной мере отражает современное состояние исследований по теме диссертации и состоит из двух глав. В главе 1 дается краткая характеристика дереворазрушающих грибов и рассматривается их функциональная классификация по типу вызываемой ими гнили. Также подчеркивается особая важность дереворазрушающих грибов порядка Polyporales и рассматривается эволюционная классификация данного порядка. В обзоре также дается подробное описание двух основных классов лигнинолитических фермента грибов белой гнили – лакказ и пероксидаз. Представлена общая их характеристика и описывается механизм действия, в историческом аспекте рассматривается развитие представлений об участии данных ферментов в процессах лигнинолиза, приводится краткое суммирование имеющихся на данный момент данных относительно множественной копийности генов лакказ и пероксидаз в геномах дереворазрушающих грибов. Наиболее ценным является краткая сводка относительно возможных способов применения лакказ и пероксидаз дереворазрушающих грибов в процессах биодеструкции ксенобиотиков и валоризации лигнина, представленная в конце главы.

В разделе «**Материалы и методы**» приведено подробное описание использованных в работе экспериментальных протоколов. Все использованные в работе методики полностью соответствуют задачам исследования. Подробное описание каждого протокола обеспечивает воспроизводимость полученных результатов и отражает высокую квалификацию соискателя. Следует отметить разнообразие используемых методов, как

классических микробиологических и биохимических, так и современных химико-аналитических и биоинформатических, которые детально описаны в данном разделе.

Раздел «**Результаты и их обсуждение**» состоит из 5 частей и составляет основу диссертационной работы. Сначала рассматривается состав мультигенных семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз *T. hirsuta*, приводится информация об их локализации на хромосомах, экзон-интронной структуре и предсказываются возможные сайты гликозилирования белковых продуктов. Также проводится фундаментальное обобщение процесса эволюционного формирования семейств лакказ и пероксидаз в дереворазрушающих грибах порядка Polyporales, на основе которого выделяются ортологические группы генов, включающие в себя гены *T. hirsuta*. Результаты представлены наглядно. Автор утверждает о выявлении существенного пробела в современных знаниях о физико-химических и каталитических свойствах лакказ и лигнинолитических пероксидаз. Далее рассмотрены особенности транскрипции и секреции лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании *T. hirsuta* на контрольной среде и средах, содержащих в синтетический краситель бромкрезоловый зеленый и крафт лигнин. Установлены закономерности транскрипции изучаемых оксидоредуктаз. Завершающая глава по поиску закономерности изменения молекулярного состава лигнина под действием лигнинолитической системы *T. hirsuta*. Автором высказано предположение субстратной специфичности пероксидаз, секретлируемых грибом белой гнили в процессе модификации ароматического биополимера. Заключение сформулировано кратко, но емко, далее следует 5 ключевых выводов по работе. Масштаб приведенных результатов исследований и их обсуждение подтверждается тем, что в работе рассмотрен большой массив генов грибов белой гнили - семь полифункциональных генов лакказ (lacA - lacG), один непротранскрибированный псевдоген (lacH), 18 полифункциональных генов лигнинолитических пероксидаз (MnP1-MnP7, LiP1-LiP9, VP1, VP2).

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе в целом

Анализируя диссертацию в целом, следует отметить, что работа написана доступным для понимания языком, хорошо проиллюстрирована и имеет логическое последовательное изложение материала. Исследование хорошо продумано и аккуратно выполнено. Цель работы четко сформулирована, задачи соответствуют цели исследования. Автором применены современные биохимические и другие методы. К положительным сторонам работы следует отнести тот факт, что были использованы оригинальные подходы, разработанные в лаборатории, в которой выполнялись исследования. Во многом благодаря их применению, автору удалось достигнуто выполнение цели и задач работы. Рисунки и таблицы выполнены качественно и хорошо иллюстрируют полученные автором результаты. Выводы по работе представляются достаточно полными и убедительными. Материалы автореферата соответствуют данным диссертационной работы, и он конспективно отражает общее содержание диссертации.

Далее приводятся несколько замечаний и вопросов, возникших при ознакомлении с представленной работой:

1. При столь подробном рассмотрении опубликованных на сегодняшний день работ по эволюции лакказ и лигнинолитических пероксидаз в обзоре литературы

отсутствует ссылка на опубликованное в 2021 г. исследование «Геномный анализ проливает свет на эволюцию образа жизни Agaricales и увеличение разнообразия пероксидаз» (Ruiz-Dueñas F.J., Barrasa J.M., Sánchez-García M., Camarero S., Miyauchi S. et al. Genomic analysis enlightens Agaricales lifestyle evolution and increasing peroxidase diversity. *Mol. Biol. Evol.* 13, 38(4):1428-1446. doi: 10.1093/molbev/msaa30) и обзор 2022 г. «Реконструкция предковой последовательности как инструмент изучения эволюции дереворазрушающих грибов» (Ayuso-Fernández I., Molpeceres G., Camarero S., Ruiz-Dueñas F.J. and Martínez A.T. Ancestral sequence reconstruction as a tool to study the evolution of wood decaying fungi. *Front. Fungal Biol.* 3:1003489. doi: 10.3389/ffunb.2022.1003489), хотя более ранние работы этих исследовательских групп достаточно подробно освещены.

2. Как в случае лакказ, так и в случае пероксидаз, на рисунках, демонстрирующих результат согласования дерева генов с деревом видов, в подписи отсутствует указание того, что на дереве генов обозначают треугольники. Хотя в случае диссертации данное указание не является обязательным, в автореферате (Рисунки 1 и 2) его отсутствие затрудняет восприятие, поскольку в тексте автореферата не показывается полностью «развернутое» дерево генов по которому можно определить, как выглядели «сложенные» клады.
3. Насколько общепотребимым является значение слов «изофермент» и «изоформа», используемые в диссертационной работе?
4. Учитывая важную роль эволюционной составляющей в работе, проводилась ли филогенетическая реконструкция с использованием байесовского подхода или использовался исключительно метод максимального правдоподобия?
5. Какими соображениями руководствовались при выборе использованного в работе лигнина (CAS 8068-05-1, Sigma-Aldrich, США)? В работе нет информации, из каких видов древесины он получен, лиственных или хвойных? Известно, что в Российской Федерации преобладающим методом делигнификации древесины в процессах получения целлюлозно-бумажных полуфабрикатов является сульфатный или крафт способ. Несмотря на то, что получение препаратов лигнина трудоемкая задача, представляет интерес использования промышленных образцов от отечественных предприятий, работающих по различающимся режимам и видам используемого сырья.
6. В работе встречаются не очень удачные выражения, например, «гемицеллюлоза» (стр. 10), в русском языке этот термин используется как правило во множественном числе; «углеводная и лигниновая компоненты» (стр. 13). Понятие «крафт-лигнин» в ряде случаев пишется через дефис (стр. 82,83 и др.), в ряде – в 2 слова (стр. 2, 28). Целесообразно использовать выражение «сульфатный лигнин», что является общепринятым в отечественной научной и технической литературе.

В виде пожелания хотелось бы порекомендовать Константину Валерьевичу не останавливаться на достигнутом, продолжить свои исследования, и обратить большее внимание на прикладные аспекты проводимых исследований как с точки зрения детоксификации загрязнителей окружающей среды, так и биотрансформации различных полимеров.

В целом, возникшие вопросы и сделанные замечания не снижают общей высокой оценки рассматриваемой диссертационной работы. Диссертационная работа Моисеенко Константина Валерьевича является законченным научным трудом. По материалам диссертации опубликовано 9 статей в международных рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК, и 6 тезисов докладов научных конференций. Результаты работы, изложенные в автореферате, полностью соответствуют содержанию диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Моисеенко Константина Валерьевича «Лакказы и лигнинолитические пероксидазы дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*: эволюция, транскрипция, секреция и участие в процессах биодеструкции» полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней», утверждённым постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, пункт 9. Автор диссертации Моисеенко Константин Валерьевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

член-корреспондент РАН
доктор биологических наук
директор ФГБУН «Федеральный
исследовательский центр комплексного
изучения Арктики им. академика Н.П.
Лаверова Уральского отделения Российской
академии наук»
163069, Россия, г. Архангельск, проспект
Никольский, 20
Тел.: +79212445322,
электронная почта: inepras@yandex.ru
Шифр специальности – 03.00.16 “Экология”

Болотов
Иван Николаевич



Подпись И.Н. Болотова заверяю

Дата 14.09.2023

Гербовая печать

