

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **МОЙСЕЕНКО 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

В диссертационной работе Моисеенко К.В. проведен детальный анализ семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*, вызывающего белую гниль древесины. Были исследованы предполагаемые особенности формирования этих семейств в контексте эволюции лакказ и пероксидаз грибов порядка Polyporales. Был проведен анализ изменения представленности изоферментов лакказ и пероксидаз в экзопротеоме, а также анализ изменения уровней транскрипции генов лакказ и пероксидаз при культивировании *T. hirsuta* в присутствии синтетического красителя и лигнина. Был проведен анализ состава продуктов деградации лигнина, и полученные данные сопоставлены с таковыми по составу экзопротеома.

Актуальность исследования

Тема исследования актуальна в связи с тем, что исследуемые в работе группы ферментов являются основными компонентами уникального лигнинолитического комплекса грибов белой гнили – одной из немногих, если не единственной, группы организмов, способной разрушать и метаболизировать лигнин. Широкое распространение грибов белой гнили в лесных экосистемах придает изучению их лигнинолитического комплекса неоспоримое фундаментальное значение.

Второй аспект актуальности связан с высоким биотехнологическим потенциалом лакказ и лигнинолитических пероксидаз грибов белой гнили, которые могут применяться для биодеструкции ксенобиотиков и валоризации лигнина. Исследование природного разнообразия изоферментов лакказ и пероксидаз, а также понимание того, как эти изоферменты используются грибом при осуществлении процессов биодеструкции необходимо для научно обоснованного выбора тех или иных изоферментов с желаемыми свойствами с целью их последующего биотехнологического использования как индивидуально, так и в составе комплексных ферментных систем.

Структура диссертации

Диссертация Моисеенко К.В. содержит все необходимые разделы, а именно «Введение», «Обзор и анализ литературных источников», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение» и «Список используемых источников». Работа изложена на 95 страницах, содержит 25 рисунков и 4 таблицы.

В разделе «Введение» отмечена актуальность темы работы, сформулированы цели и задачи исследования, разъяснены научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Раздел «Обзор и анализ литературных источников» описывает текущий уровень знаний в ряде областей биологии, связанных с темой диссертационной работы. В частности, подробно описаны различные типы дереворазрушающих грибов и текущее состояние знаний об их лигнинолитической системе. Структурированный в исторической последовательности стиль изложения материала позволяет не только в полной мере оценить существующий прогресс в области исследования лигнинолитической системы грибов белой гнили, но и подчёркивает все еще оставшиеся существенные пробелы в знаниях касательно ее функционирования. Раздел заканчивается краткой сводкой возможных способов применения лакказ и лигнинолитических пероксидаз грибов белой гнили для биодеструкции ксенобиотиков и валоризации лигнина.

Глава «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание методов, использованных в работе, и ссылки на оригинальные работы, в которых были разработаны описанные методики.

В главе «Результаты и обсуждение» приведены и проанализированы результаты проведенных экспериментов. Глава состоит из 5 разделов. Первый раздел описывает состав мультигенных семейств лакказ и лигнинолитических пероксидаз *T. hirsuta* и отмечает особенности формирования этих семейств в контексте эволюции лакказ и пероксидаз грибов порядка Polyporales. Последующие три раздела описывают секрецию и транскрипцию лакказ и лигнинолитических пероксидаз при культивировании на контрольной среде, среде, содержащей синтетический краситель, и среде, содержащей лигнин. Пятый раздел описывает исследование участия лакказ и лигнинолитических пероксидаз в процессе деградации крафт лигнина путем сопоставления изменения молекулярного состава лигнина с составом воздействующего на него комплекса лигнинолитических ферментов *T. hirsuta*.

В главе «Заключение» суммированы результаты исследования.

Степень достоверности результатов и обоснованности выводов, сделанных автором, а также научная новизна и практическая значимость исследования

Полученные в работе результаты полностью подтверждены экспериментальными данными – использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны; полученные экспериментальные закономерности статистически достоверны. Сформулированные в тексте диссертации научные положения и выводы полностью подтверждаются полученными результатами.

В представленной работе впервые для грибов порядка Polyporales проведен детальный эволюционный анализ формирования семейства генов лакказ и лигнинолитических пероксидаз, а также предложена классификация их изоферментов на основе отношения ортологии. Впервые для гриба белой гнили одновременно на уровне протеома и транскриптома проведен анализ вовлеченности различных изоферментов лакказ и пероксидаз в процесс биодеструкции синтетического красителя и лигнина. Впервые проведен анализ состава продуктов деградации лигнина грибом белой гнили и полученные данные сопоставлены с таковыми по составу экзопротеома.

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается во всестороннем изучении мультигенных семейств лакказ и пероксидаз для типичного представителя грибов белой гнили *T. hirsuta*, а также в возможности экстраполяции выявленных закономерностей на другие грибы порядка Polyporales, исходя из установленных в работе ортологических групп. С практической точки зрения, полученные в ходе работы данные о молекулярном составе продуктов окислительной деполимеризации лигнина, образующихся под воздействием лигнинолитической системы *T. hirsuta*, позволяют в дальнейшем оптимизировать процессы его валоризации через низкомолекулярные соединения.

Опубликование результатов диссертации

Результаты и выводы диссертационной работы Моисеенко К.В. представлены в 9 статьях, опубликованных в специализированных рецензируемых зарубежных журналах, включенных в систему цитирования Web of Science, и 6 тезисах докладов на международных конференциях.

Замечания к работе

К работе сформированы следующие замечания:

- 1) В диссертации не указано, насколько актуальна биотехнологическая валоризация лигнина через низкомолекулярные соединения, по сравнению с другими способами использования лигнина. Продукты деполимеризации лигнина наверняка токсичны и не могут быть эффективно усвоены в микробиологическом синтезе. В то же время из лигнина делается ряд широко востребованных продуктов - это полимерные материалы, фенолформальдегидные смолы, клеящие композиции в производстве ДСП, картона, фанеры и др. Гидролизный лигнин служит котельным топливом в лесохимических производствах, а также сырьём для получения гранулированного активированного угля, пористого кирпича, удобрений, уксусной и щавелевой кислот, наполнителей.
- 2) В диссертации не указан источник последовательности генома *T. hirsuta* – неопубликованные данные автора, или последовательность, заложенная в публично доступную базу данных. В последнем случае, она должна быть аннотирована автоматически, и тогда не ясен вклад автора в идентификацию генов лакказ и пероксидаз.
- 3) Результаты, представленные в выводе 2, корректнее было бы представлять (как в этом выводе, так и в тексте Результатов) как предположительные, а не как доказанные. Они основаны не на исследовании геномов *T. hirsuta*, отобранных в Меловом и других древних периодах, а на биоинформатической обработке геномов современных организмов.
- 4) Автор не поясняет, как знание эволюционной истории генов исследованных ферментов может помочь научно обоснованному выбору ферментов для практических задач. В связи с этим часть работы, посвящённая эволюционному анализу, выглядит не совсем связанной с практической частью работы, посвящённой анализу секреции и транскрипции, а также характеру деградации лигнина.

Также, необходимо отметить мелкие недочёты текста, например, ошибки в некоторых заголовках («2.2.2 Исследование продуктов деградации крафт лигнина методом», «2.2.1 Исследование состава экзопротеома методом»).

Вышеизложенные вопросы и замечания не снижают научной значимости и высокого уровня работы, и не снижают её общую положительную оценку.

Заключение.

Диссертация Моисеенко К.В. является завершённой работой, выполненной на хорошем методическом уровне с использованием всех необходимых современных биохимических методов; её содержание полностью соответствует всем требованиям, представленным в «Положении о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842. Достоверность результатов, полученных автором в рамках проведенных исследований, не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, адекватны поставленным целям и полученным результатам. Приведённые замечания не снижают уровня и значимости работы. Автор диссертационной работы заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Лавров Константин Валерьевич

кандидат биологических наук по специальности 03.02.07 Генетика

начальник лаборатории Молекулярной биотехнологии

ККГИ НИЦ «Курчатовский институт»

117545, Россия, г. Москва 1-й Дорожный проезд, д. 1

Тел.: +7 (495) 315-01-83,

электронная почта: lavrov.ko@gmail.com



Лавров К.В.

Подпись К.В. Лаврова заверяю:

Главный ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»

Борисов Кирилл Евгеньевич



« 2 » сентября

2023 г.

Борисов К.Е.