



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.Н. БАХА

119071 РФ, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

12 ИЮЛЬ 2023

№ 85-01-19/571

На №

от



«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора
Федерального государственного
учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН»
д.б.н. Федоров А.Н.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на
диссертационную работу Моисеенко К.В.

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

Диссертационная работа «Лакказы и лигнинолитические пероксидазы дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*: эволюция, транскрипция, секреция и участие в процессах биодеструкции» выполнена на базе лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (далее ФИЦ Биотехнологии РАН), где в период подготовки диссертационной работы соискатель Моисеенко Константин Валерьевич исполнял обязанности младшего научного сотрудника. Тема диссертационной работы «Лакказы и лигнинолитические пероксидазы дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*: эволюция, транскрипция, секреция и участие в процессах биодеструкции» утверждена на заседании Ученого Совета ФИЦ Биотехнологии РАН (Протокол № 1 от 19.01.2023).

В июне 2009 года Моисеенко К.В. окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Архангельский государственный технический университет» с присуждением квалификации инженера по специальности «Биотехнология», после чего с 2012 по 2016 обучался в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (с июля 2015 переименован в ФИЦ Биотехнологии РАН). С 2012 и по настоящее время работает в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

Научный руководитель – доктор биологических наук Куликова Наталья Александровна, ведущий научный сотрудник лаборатории агроэкологии кафедры общего земледелия и агроэкологии факультета почвоведения ФГОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова".

Подготовленная диссертационная работа Моисеенко К.В. была представлена 28 апреля 2023 года на совместном семинаре лабораторий молекулярных основ биотрансформаций, биотехнологии ферментов, химической энзимологии, иммунобиохимии и биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

По результатам рассмотрения диссертации «Лакказы и лигнинолитические пероксидазы дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*: эволюция, транскрипция, секреция и участие в процессах биодеструкции» принято следующее заключение:

Актуальность работы. Уникальный комплекс окислительных экзоферментов, секретируемый дереворазрушающих базидиальными грибами, вызывающими белую гниль древесины (грибы белой гнили, **ГБГ**), является крайне привлекательным с биотехнологической точки зрения объектом исследования, а важность **ГБГ** в различных земных экосистемах придает его изучению неоспоримое фундаментальное значение. Уникальность окислительных экзоферментов **ГБГ** прежде всего проявляется в их способности катализировать разрушение разнообразных низкомолекулярных фенольных соединений и способствовать деполимеризации лигнина.

На данный момент низкомолекулярные фенольные соединения являются одной из основных групп чужеродных для живых организмов химических соединений (ксенобиотиков), попадающих в окружающую среду в результате хозяйственной деятельностью человека. Способность ферментных систем **ГБГ** окислять широкий спектр ксенобиотиков, включая гербициды, пластификаторы и синтетические красители, дает им огромный потенциал для биоремедиации вод и грунтов. Однако, недостаточное понимание того, какие именно ферменты используются тем или иным **ГБГ** для разрушения того или иного ксенобиотика существенно затрудняет продвижения в данном направлении.

Лигнин является вторым по распространенности после целлюлозы биополимером на земле и первым по трудности деполимеризации среди всех известных биополимеров. В настоящее время одной из основных концепций получения продуктов с добавочной стоимостью из лигнина является его биотехнологическая валоризация через низкомолекулярные соединения, которые в дальнейшем могут быть использованы в микробиологическом синтезе. При этом, для получения фрагментов лигнина пригодных к включению в микробный метаболизм предлагается использовать ферментные системы **ГБГ**. Без понимания деталей функционирования лигнинолитической системы **ГБГ** и знания продуктов разложения лигнина, получающихся в результате ее работы, данная биотехнологическая концепция является неосуществимой.

Таким образом исследование комплекса окислительных экзоферментов **ГБГ** актуально как с теоретической, так и с практической точки зрения.

Целью данной работы является исследование особенностей эволюционного формирования и участия в процессах биодеструкции лакказ и лигнинолитических пероксидаз гриба *T. hirsuta*.

Научная новизна. В настоящей работе впервые проведен эволюционный анализ формирования семейства генов лакказ и пероксидаз в грибах порядка Polyporales. Впервые предложена классификация изоферментов лакказ и пероксидаз на основе образуемых ими ортологических групп. Впервые для **ГБГ**, культивируемого в присутствии синтетический красителя и лигнина, проведен анализ изменения состава экзопротеома, а также изменения уровней транскрипции для всех генов лакказ и пероксидаз. Впервые проведен анализ изменения состава продуктов деградации лигнина **ГБГ** и полученные данные сопоставлены с таковыми по изменению состава экзопротеома.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость настоящего исследования заключается во всестороннем изучении мультигенных семейств лакказ и пероксидаз для типичного представителя ГБГ – *T. hirsuta*. Полученные результаты в дальнейшем позволят понять индивидуальную роль каждого изофермента как в процессе биодegradации ксенобиотиков ГБГ, так и в процессе биотрансформации растительных и древесных субстратов этими грибами.

С практической точки зрения предложенная в данной работе классификация лакказ и пероксидаз с использованием концепции ортологических групп формирует научную основу для направленного выбора их изоферментов, обладающих желаемыми для целевых биотехнологических процессов свойствами. Так же полученные в ходе работы данные о молекулярном составе продуктов окислительной деполимеризации лигнина, образующиеся под воздействием лигнинолитической системой *T. hirsuta*, позволяют в дальнейшем оптимизировать процессы его валоризации через низкомолекулярные соединения.

Личный вклад диссертанта. Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию результатов.

Степень достоверности результатов. 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.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите. Представленная Моисеенко К.В. диссертационная работа посвящена исследованию лакказ и лигнинолитические пероксидаз дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta* – их эволюции, транскрипции, секреции и участию в процессах биодеструкции. Тема и содержание диссертации полностью соответствует специальности 1.5.4. Биохимия, по которой она рекомендуется к защите.

Апробация работы. Полученные результаты были представлены на следующих российских и международных научных конференциях: Международная научная конференция: Международная научная конференция «Биотехнологии в химико-лесном комплексе» (г. Архангельск, Россия, 2014); Международная научно-практическая конференция «Dead Wood Meeting» (г. Ламми, Финляндия, 2015 г.); 2-й Международный семинар по цифровой ПЦР (г. Санкт-Петербург, Россия, 2016); 38-й (г. Санкт-Петербург, Россия, 2013), 43-й (г. Прага, Чехия, 2018 г) и 45-й (г. Любляна, Словения, 2021) Международные конгрессы Федерации Европейских биохимических обществ – FEBS; 8-я международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (г. Ялта, Россия, 2020).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 статей в международных рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК, и 6 тезисов докладов научных конференций.

Список публикаций по теме диссертации:

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Pavlov, A. R., Tyazhelova, T. V., **Moiseenko, K. V.**, Vasina, D. V., Mosunova, O. V., Fedorova, T. V., ... & Koroleva, O. V. Draft genome sequence of the fungus *Trametes hirsuta* 072 // Genome announcements, 2015, V. 3 (6), e01287-15.
2. **Moiseenko, K. V.**, Maloshenok, L. G., Vasina, D. V., Bruskin, S. A., Tyazhelova, T. V., & Koroleva, O. V. Laccase multigene families in Agaricomycetes // Journal of Basic Microbiology, 2016, V. 56(12), P. 1392-1397.
3. Vasina, D. V., **Moiseenko, K. V.**, Fedorova, T. V., & Tyazhelova, T. V. Lignin-degrading peroxidases in white-rot fungus *Trametes hirsuta* 072. Absolute expression quantification of full multigene family // PLoS One, 2017, V. 12(3), e0173813.
4. Savinova, O. S., **Moiseenko, K. V.**, Vavilova, E. A., Tyazhelova, T. V., & Vasina, D. V. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: twins with different faces // Biochimie, 2017, V. 142, P. 183-190.
5. **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.
6. **Moiseenko K.V.**, Vasina D.V., Farukshina K.T., Savinova O.S., Glazunova O.A., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. Orchestration of the expression of the laccase multigene family in white-rot basidiomycete *Trametes hirsuta* 072: evidences of transcription level subfunctionalization. // Fungal biology, 2018, V. 122(5): P. 353-362.
7. 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, V. 10: 152.
8. **Moiseenko K.V.**; Glazunova O.A.; Shakhova N.V.; Savinova O.S.; Vasina D.V.; Tyazhelova T.V.; Psurtseva N.V.; Fedorova T.V. Fungal Adaptation to the Advanced Stages of Wood Decomposition: Insights from the *Steccherinum ochraceum* // Microorganisms, 2019, V. 7: 527.
9. **Moiseenko K. V.**, Glazunova O. A., Savinova O. S., Vasina D. V., Zhrebker A. Y., Kulikova N. A., Nikolaev E.N., Fedorova T. V. Relation between lignin molecular profile and fungal exo-proteome during kraft lignin modification by *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 // Bioresource Technology, 2021, 125229.

Тезисы докладов:

1. Maloshenok L. G., **Moiseenko, K. V.**, Fedorova T. V., Bruskin S. A, & Koroleva O. V. // 38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2013, St. Peterburg, Russia, 6-11 July 2013, FEBS Journal, Vol. 280, Suppl.S1, P. 10.
2. **Moiseenko K. V.**, Maloshenok L. G., Vasina D. V., Tyazhelova T. V., Fedorova T. V., Bruskin S. A, & Koroleva O. V. New next generation sequencing based method for exploration of laccase multigene family in basidiomycetes fungi // Biotechnologies in chemical and forest industry, Arkhangelsk, Russia, 11-12 September 2014, Proceedings international scientific conference, 31-35.
3. 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) 2018, Prague, Czech Republic, 7-12 July 2018, FEBS OpenBio, Vol. 8, Suppl.S1, P.

173.

4. **Moiseenko K. V.**, Savinova O. S., Glazunova O. A., Sinitsyn A. P. & Fedorova T. V. Application of ESI FT-ICR MS to Study Kraft Lignin Modification by the Exoenzymes of the White Rot Basidiomycete Fungus *Trametes hirsuta* LE-BIN 072. // 8th Scientific and Practical Conference "Biotechnology: Science and Practice", Yalta, Russia, 22-26 September 2020, KnE Life Sciences (Jan 13, 2022), 412-417.
5. **Moiseenko K. V.**, Savinova O. S., Glazunova O. A., Vasina D. V., Zhrebker A. Y., Kulikova N. A. & Fedorova T. V. Changes in the molecular profile of compounds released from plant lignin during the process of its fungal decomposition. // 45th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2021, Ljubljana, Slovenia, 3-8 July 2021, FEBS OpenBio, Vol. 11, Suppl.S1, P. 387.
6. Glazunova O. A., **Moiseenko K. V.**, Savinova O. S., Vasina D. V., Tyazhelova T. V. & Fedorova T. V. Evolutionary relationships between the laccase genes of Polyporales // 45th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2021, Ljubljana, Slovenia, 3-8 July 2021, FEBS OpenBio, Vol. 11, Suppl.S1, P. 130.

Рекомендуемые оппоненты:

Болотов Иван Николаевич, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н. П. Лаврова Уральского отделения Российской академии наук».

Лавров Константин Валерьевич, кандидат биологических наук, начальник лаборатории молекулярной биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Рекомендуемая ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Диссертационную работу Моисеенко Константина Валерьевича «Лакказы и лигнинолитические пероксидазы дереворазрушающего гриба *Trametes hirsuta*: эволюция, транскрипция, секреция и участие в процессах биодеструкции» является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует критериям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Правительством РФ от 24.09.2013 г. №842, и профилю диссертационного совета 24.1.233.01 на базе Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. Работа отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть представлена к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

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

