

# ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

## Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

142290, Московская обл., г. Пушкино, просп. Науки, д. 5  
Тел./факс: (495) 956-33-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru, http://www.ibpm.ru  
ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОГРН 1025007771491, ОКПО 02699702, ОКВЭД 73.10, ОКОПФ 20903  
Отдел №34 УФК по Московской области (ИБФМ РАН лицевой счет 20486187560)  
Р/с 40501810300002000104 в Отделении 1 Москва; БИК 044583001

27.11.2015г № 114-03.4-1

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ:

Зам. директора

Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института биохимии и  
физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина  
Российской академии наук, д.б.н.



Леонтьевский А.А.

27 ноября 2015 г.

### Отзыв

ведущей организации на диссертационную работу Васиной Дарьи Владимировны  
«Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба  
*Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина», представленную на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия»

Постоянное увеличение объемов производства целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности обуславливает возрастание отходов переработки сырья и увеличение техногенной нагрузки на окружающую среду. Существующие методы утилизации данных отходов не обеспечивают выполнение требований, предъявляемых к экологичности современного производства. В то же время активно растет интерес к биоконверсии лигноцеллюлозных отходов за счет применения ферментных препаратов различного действия в основном грибного происхождения. Именно поэтому базидиальные грибы – деструкторы лигнина привлекают внимание исследователей, представляя собой перспективный компонент технологии биоконверсии лигноцеллюлозных отходов.

В свете этого, проблема изучения ферментов лигнинолитического комплекса базидиальных грибов является актуальной задачей. Одним из наиболее перспективных, с точки зрения промышленного использования, ферментов является лакказа, относящаяся к группе голубых оксидаз. По каталитическим свойствам, субстратной специфичности и биотехнологическому потенциалу лакказа – практически идеальный катализатор для «зеленой химии». Тем не менее, промышленное использование лакказ ограничено, прежде всего, отсутствием их крупномасштабного производства, и как следствие, высокой стоимостью ферментных препаратов. Уровень продукции лакказ природными продуцентами является сравнительно низким и не соответствует критериям эффективного биотехнологического производства. Для решения такого рода проблем используются генно-инженерные технологии создания высокоэффективных продуцентов гетерологичного белка. Этот подход активно применяется и в случае лакказ. Однако до сих пор не получено ни одного высокоэффективного штамма-продуцента рекомбинантной лакказы, отвечающего требованиям крупнотоннажного производства, что является основным препятствием, сдерживающим использование лакказ при создании биокаталитических, биосинтетических и биосенсорных технологий.

Сложность получения рекомбинантных ферментов с заданными свойствами, адаптированных под конкретные биотехнологические процессы, связывают прежде всего с отсутствием знаний по регуляции экспрессии и продукции изоферментов лакказ.

Т.к. проведение геномных исследований базидиомицетов затруднено вследствие значительного размера геномов и сложностей при их секвенировании и аннотации, в настоящее время все большее распространение приобретает изучение протеомов, секретомов и транскриптомов природных грибных продуцентов, что в свою очередь позволяет устанавливать особенности синтеза и секреции лигнинолитических ферментов. Вышеизложенное подтверждает актуальность проделанной Васиной Д.В. работы.

Диссертация Васиной Д.В. построена по традиционной схеме. Работа изложена на 147 листах машинописного текста, иллюстрирована 33 рисунками, содержит 15 информативных таблиц. Список цитируемой литературы включает 320 источников, представленных в основном публикациями последних лет.

**Научная новизна** диссертационной работы определяется впервые проведенным подробным сравнительным исследованием семейства лакказ базидиального гриба белой гнили *T. hirsuta* на уровне секретома, протеома и транскриптома. Показано, что семейство состоит минимум из 5 генов, кодирующих лакказы и характеризующихся дифференциальной регуляцией экспрессии. Впервые был охарактеризован состав внеклеточных белков *T. hirsuta* и показана продукция специфических белков – церато-платанинов, продуцируемых в

присутствии лигноцеллюлозных материалов в среде культивирования. При оценке влияния ионов меди (используемых в качестве индуктора биосинтеза лакказ) на транскриптом базидиомицета выделены потенциальные пути, вовлеченные в биогенез лакказ.

**Во введении** обосновывается актуальность темы, формулируются цели и задачи исследования и основные положения, выносимые на защиту, обозначены научная новизна и практическая значимость работы, результаты апробации полученных данных.

**Первая глава (обзор литературы)** включает рассмотрение всех основных аспектов, значимых при постановке цели исследования и разработке стратегии ее достижения. Диссертантом подробно рассмотрены существующие данные по генетической организации базидиальных лакказ, регуляции их синтеза. Приведена характеристика структурных и каталитических свойств лакказ базидиальных грибов.

Отдельная глава посвящена анализу путей синтеза и процессинга секретируемых лакказ, в данной главе собраны немногочисленные сведения о процессах секреции, фолдинга и пост-трансляционных модификаций внеклеточных лакказ.

Диссертант убедительно доказывает необходимость проводимых исследований, что дает возможность оценить новизну полученных Васиной Д.В. данных. В целом обзор литературы дает подробное представление о предмете исследования и демонстрирует хорошее знание диссертантом современного состояния дел в области изучения базидиальных лакказ.

**В главе материалы и методы** подробно описаны применяемые в работе методики: приведены методы культивирования *Trametes hirsuta*, определения активностей лигнинолитических ферментов, описаны подходы протеомного и генетического анализа - получение внутриклеточных и внеклеточных белковых экстрактов, двумерный электрофорез, масс-спектрометрия, процедуры супрессионной вычитающей гибридизации и зеркально-ориентированной селекции образцов кДНК, RACE ПЦР, количественная ПЦР в реальном времени, а так же биоинформатический анализ данных. Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением разнообразных подходов, соответствующих поставленным задачам и позволяющих получать значимые результаты для характеристики процессов биогенеза членов мультигенного семейства лакказ.

**В третьей главе** описаны полученные автором экспериментальные результаты, приводится их обобщение и обсуждение данных. Автором убедительно доказывается, что основными компонентами лигнин-модифицирующей системы базидиомицета *T. hirsuta* являются множественные изоформы лакказ. В исследуемых условиях были идентифицированы лишь 2 изоформы лакказ (продукты генов *lacA* и *lacC*), в то время, как в транскриптоме базидиомицета обнаружено 5 генов, кодирующих лакказы.

При обсуждении результатов выдвигается интересная теория о полифункциональности членов семейства лакказ, что косвенно подтверждается *in silico* анализом последовательностей генов и изучением профилей транскрипции индивидуальных генов, кодирующих фермент. Интересными представляются результаты филогенетического анализа лакказ грибов рода *Trametes*. Кластеризация изоферментов одного вида в отдельные клады так же подтверждает гипотезу о разных свойствах этих изоферментов, и, по всей видимости, их различных физико-химических и каталитических свойствах, согласуясь с результатами бионформатического анализа.

С другой стороны, проведенный транскрипционный и протеомный анализ позволил выявить ряд белков и метаболических путей, потенциально связанных с биогенезом лакказ. Полученные данные позволили заключить, что механизм регуляции синтеза лакказ главным образом осуществляется на уровне посттрансляционных модификаций, а не на уровне транскрипции и секреции белка.

Важное **практическое и теоретическое** значение работы определяется проведенным сравнительным изучением секретомов, протеомов и транскриптомов базидиального гриба. Анализ регуляции экспрессии и продукции членов мультигенного семейства лакказ представляет интерес с точки зрения фундаментальных исследований. При этом всесторонне был охарактеризован состав лигнин модифицирующей системы *T. hirsuta*, что, безусловно, представляет интерес для биотехнологического применения штамма. С одной стороны, выявленные закономерности регуляции биогенеза лакказ открывают перспективы для создания рекомбинантных ферментов для конкретных биологических целей, с другой стороны – результаты, полученные по составу секретомов *T. hirsuta* позволяют оптимизировать технологии биоконверсии растительного сырья на основе грибов этого рода. Полученные данные представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков, работающих в различных областях биотехнологии, биохимии, молекулярной биологии.

Представленные в диссертации материалы свидетельствуют об успешном решении задач исследования и получении новых научных данных, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение. Цели и задачи, поставленные в диссертации, достигнуты полностью.

По диссертации имеются следующие замечания и пожелания, которые не влияют на результаты и выводы работы.

Несмотря на то, что работа написана грамотным научным языком, имеется ряд заимствований и жаргонизмов, которые было бы логичнее заменить на русскоязычные аналоги. В наибольшей степени это относится к генетической части работы. Так, например,

встречающееся в тексте словосочетание «забанкированные последовательности» уместнее заменить на «депонированные». Так же можно найти адекватные аналоги таким названиям, как «драйвер» и «трейсер», используемые при описании процедуры супрессионной вычитающей гибридизации.

Для идентифицированных внутриклеточных белков при исследовании протеома получены такие низкие значения Score, что следовало бы более подробно обсудить, а также привести подробный анализ количества пептидов и их аминокислотных последовательностей, по которым проводилась идентификация.

В геномах ряда исследованных базидиомицетов обнаружено значительно больше генов лакказ, чем в работе диссертанта (5 генов). Следовало бы уточнить, является ли это ограничением используемых методов, результатом изучения именно этого штамма или объясняется другими причинами.

Вышеизложенные замечания носят частный характер и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту.

**Апробация работы.** Основные результаты отражены в четырех статьях в российских и зарубежных рецензируемых изданиях, доложены на международных конгрессах и конференциях. В автореферате адекватно отражены содержание диссертационной работы, проведенные эксперименты и полученные результаты. Выводы адекватно обоснованы.

Материалы диссертационной работы могут быть полезны в работе таких научных организаций как Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН), Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ФГУП ГосНИИГенетика), Институт физиологии растений, Биологический и Химический факультеты Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

**Общее заключение.** Диссертационная работа Васиной Дарьи Владимировны «Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина» является законченным научным исследованием, которое по содержанию, актуальности выбранной темы, структуре и уровню выполнения поставленных задач, степени обоснованности выносимых на защиту положений и выводов полностью удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013г. № 842, и отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует специальности 03.01.04 Биохимия. Соискателем выполнена законченная научно-квалификационная работа, содержащая ценные результаты для биохимии –

всесторонне проанализировано семейство лакказ базидиомицета *T. hirsuta*, закономерности регуляции экспрессии и продукции его членов. Таким образом, Васина Д.В. несомненно заслуживает присуждения искомой степени ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.


Отзыв заслушан и одобрен на заседании трех лабораторий ИБФМ РАН: лаборатории микробной энзимологии, лаборатории молекулярной микробиологии и лаборатории физиологии микроорганизмов 27 ноября 2015 г. основное направление научно-исследовательской деятельности которой соответствует тематике диссертации.

Протокол заседания № 11/15

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скребина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

142292, г. Пушкино Московской области, проспект Науки 5.  
Тел./факс: +7-495-956-33-70, эл.почта: boronin@ibpm.pushchino.ru

  
Лисов Александр Викторович, кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник лаборатории микробной энзимологии ИБФМ РАН,

  
Захарова Марина Викторовна, кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ИБФМ РАН,

  
Вайнштейн Михаил Борисович, доктор биологических наук,  
профессор, заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН

27 ноября 2015 г.

