

На правах рукописи

Савинова Ольга Сергеевна

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИНОРНЫХ
ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАККАЗ БАЗИДИОМИЦЕТА *TRAMETES
HIRSUTA* 072 В *PENICILLIUM CANESCENS* И ИХ СРАВНИТЕЛЬНАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА**

Специальность 03.01.04. Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена 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:**

доктор химических наук, профессор
Синицын Аркадий Пантелеймонович

кандидат биологических наук
Тяжелова Татьяна Владимировна

**Официальные
оппоненты:**

Корнеева Ольга Сергеевна
доктор биологических наук, профессор, 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

**Ведущая
организация:**

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
Науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский
научный центр биологических исследований Российской
академии наук»

Защита состоится « » _____ 2019 г. в ____ часов на заседании Диссертационного
совета Д 002.247.01 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 адресу:
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы
Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33,
строение 1 и на сайте <http://fbras.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Лигноцеллюлоза – один из основных источников возобновляемого органического сырья на Земле – очень устойчива к разложению, в первую очередь за счет присутствия лигнина. Утилизация отходов лигноцеллюлозной биомассы на сегодняшний день является актуальной проблемой. В природных экосистемах основными деструкторами лигноцеллюлозной биомассы являются грибы, в основном базидиомицеты. Разложение лигноцеллюлозы реализуется за счет действия уникального комплекса внеклеточных ферментов этих грибов. Одним из ключевых ферментов этого комплекса является лакказа (КФ 1.10.3.2). Субстратная специфичность и достаточно высокая стабильность этих ферментов позволяют осуществлять не только деструкцию лигноцеллюлозной биомассы, но и модифицировать различные фенольные соединения и ксенобиотики (например, гербициды и красители), что делает их востребованными в различных отраслях биотехнологии. Однако в настоящее время промышленное использование лакказ ограничено и их биотехнологический потенциал раскрыт не полностью. Это связано, в первую очередь, с отсутствием высокоэффективных продуцентов лакказ и недостатком информации об их физико-химических и каталитических свойствах.

Известно, что лакказы базидиомицетов кодируются мультигенными семействами. Количество генов в таком семействе может достигать 17, однако в культуральной среде, как правило, детектируются далеко не все изоферменты лакказ. Так, например, грибы белой гнили рода *Trametes* характеризуются продукцией одного основного конститутивного изофермента (мажорного) практически во всех условиях культивирования. Остальные изоферменты обычно представляют собой индуцибельные (минорные) формы, которые значительно отличаются от мажорных по своим свойствам. В ряде случаев получение минорных изоферментов с помощью нативных продуцентов является затруднительным, поскольку далеко не всегда удается подобрать условия культивирования, оптимальные для их биосинтеза. По этой причине у большинства представителей грибов этого рода изучены только мажорные изоферменты лакказ. Таким образом, актуальной задачей современной биохимии является поиск новых минорных лакказ и создание их эффективных продуцентов для исследования свойств.

Одним из перспективных объектов для изучения свойств минорных изоферментов лакказ является базидиальный гриб *Trametes hirsuta* 072 - эффективный деструктор лигнина. Его мультигенное семейство лакказ представлено семью генами (*lacA-lacG*). Однако только один изофермент

охарактеризован (мажорный LacA). Функции и свойства остальных изоферментов неизвестны. Поэтому сравнительное изучение свойств всех представителей мультигенного семейства лакказ этого гриба актуально как с фундаментальной, так и с практической точек зрения.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является получение и сравнительное изучение свойств рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

- выбор подходящей экспрессионной системы для гетерологичной экспрессии минорных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072;
- получение штаммов-продуцентов рекомбинантных минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 с помощью методов генетической инженерии;
- выделение и очистка рекомбинантных минорных изоферментов лакказ;
- исследование физико-химических и каталитических свойств минорных рекомбинантных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 и проведение сравнительного анализа свойств минорных изоферментов со свойствами мажорного изофермента LacA;
- исследование потенциала биотехнологического применения минорных изоферментов лакказ для обезвреживания отходов различных отраслей промышленности, содержащих токсичные соединения (на примере красителей).

Научная новизна. В настоящем исследовании впервые с помощью гетерологичной экспрессии в аскомиците *Penicillium canescens* получены три эффективных продуцента рекомбинантных минорных изоферментов лакказ (rLacC, rLacD и rLacF) базидиомицета *T. hirsuta* 072. Эти рекомбинантные изоферменты впервые выделены, очищены и охарактеризованы. Определены температурные и pH-оптимумы активности минорных изоферментов и их термостабильность, изучены спектральные и каталитические свойства изоферментов, а также их субстратная специфичность. Проведен комплексный сравнительный анализ свойств минорных изоферментов со свойствами мажорного изофермента LacA и выявлены их сходства и отличия. Обнаружено, что минорные изоферменты rLacD и rLacF проявляют бóльшую эффективность при деградации красителей конго красного и фенолового красного в составе лакказа-медиаторных систем (ЛМС), чем мажорный LacA, что делает эти изоферменты потенциально перспективными для применения в биотехнологии.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Теоретическая значимость настоящего 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.

С практической точки зрения 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.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспрессионная система на основе аскомицета *P. canescens* является наиболее эффективной для гетерологичной экспрессии минорных изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072. С помощью методов генетической инженерии сконструированы плазмиды, несущие последовательности, кодирующие целевые гены 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 *T. hirsuta* 072 выделены в гомогенном виде в количестве, достаточном для их характеристики. Изучены свойства минорных изоферментов (молекулярные массы, ИЭТ, температурные и рН-зависимости активности, термостабильность, каталитические свойства, субстратная специфичность, ОВП) и проведено сравнение этих свойств с таковыми мажорного изофермента LacA.
3. Минорный изофермент rLacC обладает наиболее низким среди исследованных изоферментов ОВП, проявляет низкую реакционную способность по отношению к ароматическим аминам, обладает наименьшей

термостабильностью и наиболее кислой ИЭТ, а также имеет более узкий диапазон оптимальных значений pH и температуры.

4. Минорный изофермент α LacD имеет наибольшую термостабильность и наименее кислую ИЭТ по сравнению с другими изоферментами лакказ *T. hirsuta* 072. Кроме того, α LacD обладает сниженной способностью к окислению феруловой кислоты и не способен окислять *n*-кумаровую кислоту – типичные субстраты для базидиальных лакказ.
5. Минорный α LacF является наиболее близким по своим свойствам к мажорному изоферменту LacA, однако обладает более низким ОВП;
6. Минорные члены лакказного мультигенного семейства проявляют активность при деградации различных красителей, причем изоферменты α LacD и α LacF в составе ЛМС показывают более высокую эффективность деградации красителей конго красного и фенолового красного, чем мажорный LacA, и, в перспективе, могут быть использованы для применения в биотехнологии.

Личный вклад диссертанта. Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены 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. Результаты, полученные в настоящем исследовании подтверждены экспериментально. На основании анализа полученных данных сделаны корректные выводы.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов» (г. Москва, Россия, 2014 г.), «Dead Wood Meeting & Course» (г. Ламми, Финляндия, 2016 г.), «Биокатализ-2017» (Московская область, Россия, 2017 г.), «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Минск, Республика Беларусь, 2017 г.), «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды» (г. Чебоксары, Россия, 2018 г.), «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, Россия, 2018 г.), 43-й Международный конгресс Федерации Европейских биохимических обществ – FEBS (г. Прага, Чехия, 2018 г.), XVIII Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии – Сербские Леса» (г. Белград, Сербия, 2018).

Публикации. По материалам настоящей диссертационной работы опубликовано 4 статьи (в отечественных и зарубежных журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов ВАК РФ) и 9 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

Связь с государственными программами. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ «Разработка модифицированных ферментных препаратов для эффективной биодegradации целлюлозосодержащих материалов», уникальный идентификатор проекта RFMEFI61617X0081. Соглашение о субсидии 14.616.21.0081 от 17.07.2017.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы (287 источников). Работа изложена на 156 страницах машинописного текста и содержит 22 таблицы, 27 рисунков, 3 приложения.

Список сокращений: k_{cat} - константа каталитической эффективности, K_M - константа Михаэлиса, Lac - лакказа, АБТС - азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевая соль, ГБТ - 1-гидроксибензотриазол, ГВ - гваякол, ГПХ - гель проникающая хроматография, ГХ - гидрофобная хроматография, ДМФ - 2,6-диметоксифенол, ИОХ - ионообменная хроматография, ИЭТ - изоэлектрическая точка, КЖ - культуральная жидкость, ЛМС - лакказа-медиаторная система, ОВП - окислительно-восстановительный потенциал, ПЦР - полимеразная цепная реакция, СинК - синаповая кислота; ФК - феруловая кислота; ЭФ - электрофорез.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Выбор системы экспрессии

На первом этапе настоящего исследования было необходимо выбрать такую систему экспрессии, которая бы обеспечивала достаточный выход рекомбинантных минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 с правильной конформацией и структурной организацией молекул. Ранее в нашей лаборатории удалось получить эффективный продуцент рекомбинантной мажорной лакказы А (**rLacA**) *T. hirsuta* 072 в экспрессионной системе на основе *Penicillium canescens* (Абуанова *et al.*, 2010). Однако результаты проведенного анализа литературы позволили сделать вывод, что грибы рода *Aspergillus* также являются перспективными объектами для гетерологичной экспрессии лакказ из различных источников. Для проверки этой гипотезы был получен продуцент лакказы А в грибах рода *Aspergillus nidulans* (**ANrLacA**). В качестве реципиента использовали штамм *A. nidulans* 031 (argB², pyrG89⁻) - мутант штамма мицелиального гриба *A. nidulans* FGSC #A4. Для получения продуцента была создана плаزمида pGPD-lac1-A.n., содержащая ген *lacA* (рисунок 1) гриба *T. hirsuta* (GeneBank: KP027478) под контролем сильного конститутивного

промотора *gpdA* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) *A. nidulans* и была проведена котрансформация штамма *A. nidulans* 031 полученной плазмидой. Отбор трансформантов на способность продуцировать лакказы осуществлялся путем их посева на агаризованную питательную среду, содержащую АБТС в качестве хромогенного субстрата. Колонии, вокруг которых появлялись окрашенные зоны наибольшего размера, были выбраны в качестве потенциальных продуцентов лакказы (рисунок 2).

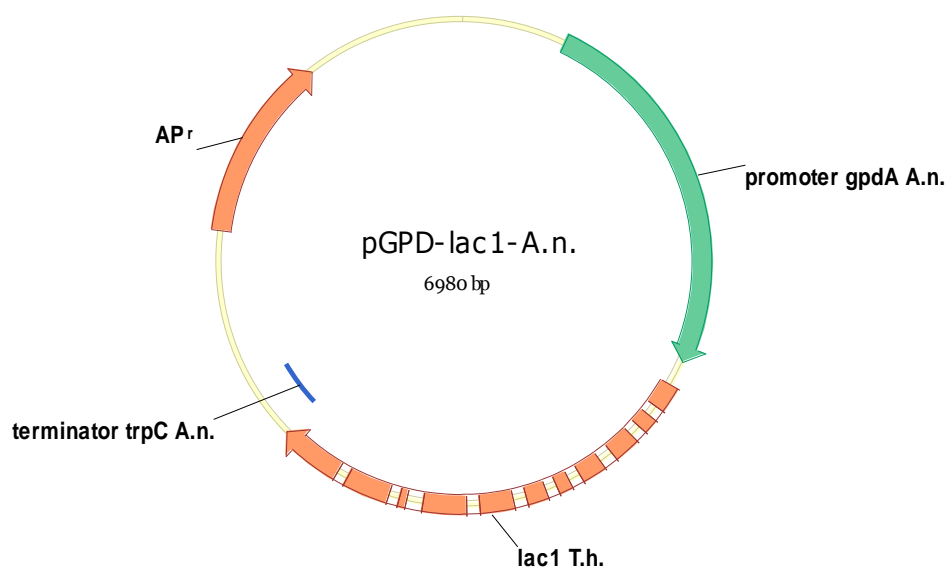


Рисунок 1 – Карта плазмиды *pGPD-lac1-A.n.*

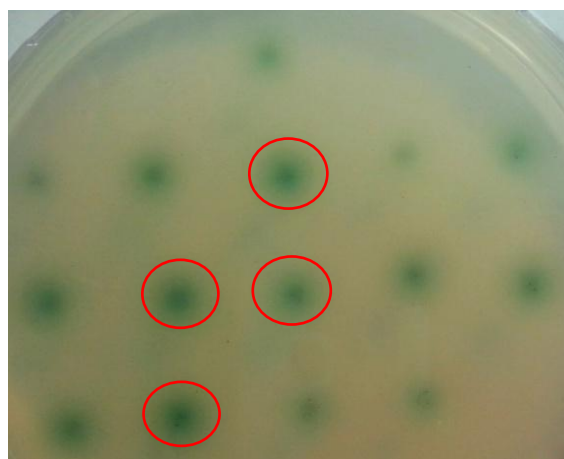


Рисунок 2 – Пример отбора трансформантов *A.nidulans* - продуцентов рекомбинантной LacA. Выбранные трансформанты выделены красным.

Отобранные трансформанты культивировали в жидкой питательной среде. Наличие плазмиды с геном *lacA* у отобранных трансформантов подтверждали ПЦР с геномной ДНК, выделенной из мицелия (рисунок 3).

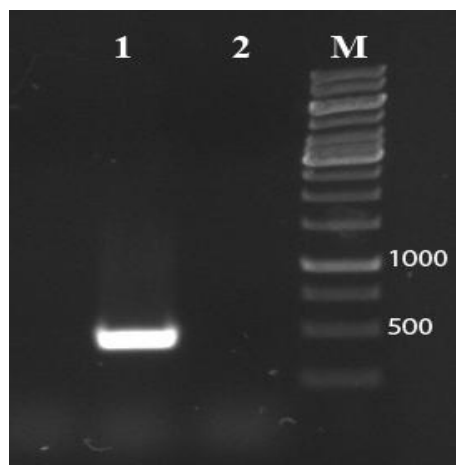


Рисунок 3 – Пример электрофореза ПЦР-фрагмента:

1- трансформант, 2- штамм-реципиент, М-маркер.

Для остальных выбранных трансформантов результаты были аналогичны.

Максимальная активность целевого рекомбинантного фермента в КЖ по субстрату АБТС составляла всего 2 усл.ед./мл. Таким образом, активность ANrLacA, полученной в *A. nidulans*, оказалась существенно ниже, чем активность rLacA, полученной ранее в *P. canescens* (до 200 усл.ед./мл КЖ по АБТС). Поскольку сравнение полученных ранее свойств и 3D структур рекомбинантной rLacA (PDB code: 5LDU) и нативной LacA (PDB code: 3FPX; Polyakov *et al.*, 2009) показало их близкое сходство, был сделан вывод, что механизмы фолдинга и посттрансляционных модификаций, свойственных *P. canescens*, больше подходят для экспрессии базидиальных лакказ. Поэтому для гетерологичной экспрессии минорных изоферментов далее использовали экспрессионную систему на основе *P. canescens*.

2. Создание продуцентов минорных лакказ

Клонирование генов, кодирующих минорные лакказы и создание плазмидных конструкций. Была разработана схема клонирования генов *lacB* (GenBank: KP027484.2), *lacC* (GenBank: KP027479.1), *lacD* (GenBank: KP027480.1), *lacE* (GenBank: KP027481.1), *lacF* (GenBank: KP027482.1) и *lacG* (GenBank: KP027483.1), кодирующих минорные изоферменты лакказ *T. hirsuta* 072, последовательности которых известны. Схема включала следующие этапы:

1. Получение ПЦР-фрагментов (геномных и кДНК копий) генов *lacB-G*.
2. Обработка ПЦР-фрагментов специфичными эндонуклеазами.
3. Последующее клонирование ПЦР-фрагментов в экспрессионный вектор pPCGNX (рисунок 4), расщепленный специфичными эндонуклеазами.

Данная схема позволила соединить ПЦР-фрагменты кодирующих областей генов лакказ с промотором гена *bgaS* без изменения нуклеотидной последовательности промоторной области гена *bgaS* и сигнального пептида генов лакказ. Полученные ПЦР-фрагменты были обработаны соответствующими рестриктазами с последующим лигированием в

экспрессионный вектор pPCGNX (рисунок 4), также обработанный соответствующими рестриктазами. Лигазная смесь была трансформирована в клетки *E. coli*. Для каждого гена были получены клоны и выделена плазмидная ДНК. Плазмиды были секвенированы и те, что не имели ошибок, были отобраны для дальнейшей трансформации в *P.canescens* (для каждого гена лакказы по 2 плазмиды, несущие интронированный и неинтронированный ген, соответственно) (таблица 1).

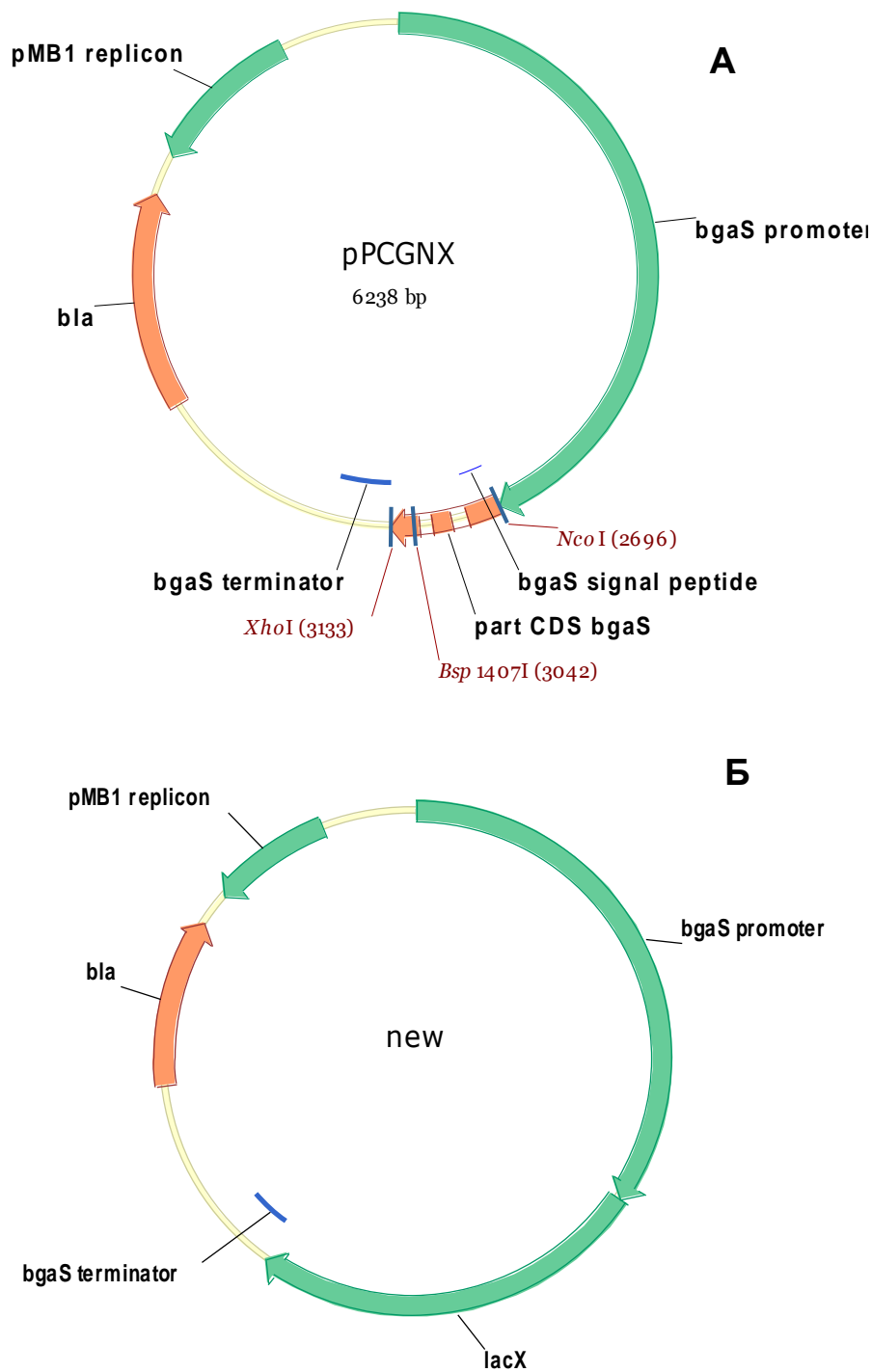


Рисунок 4 – плаزمида pPCGNX (А); общая схема плазмид с целевыми вставками (Б), где *lacX* - последовательность, кодирующая целевой изофермент (*lacB-G*).

Таблица 1 - Плазмиды, отобранные для дальнейшей трансформации

Название гена	Название плазмиды	
	С интронами	Без интронов
<i>lacB</i>	placB3	placBc2
<i>lacC</i>	placC5	placCc1
<i>lacD</i>	placD4	placDc2
<i>lacE</i>	placE6	placEc2
<i>lacF</i>	placF1	placFc3
<i>lacG</i>	placG8	placGc2

Получение трансформантов *P. canescens*. Полученные плазмиды были введены в геном *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻) путем котрансформации в протопласты совместно с плазмидой pSTA10, несущей комплементирующий ген *niaD* *A. niger*. Отбор трансформантов, содержащих соответствующие вставки, осуществляли на агаризованной среде, в которую был добавлен АБТС в качестве окрашивающего субстрата. Колонии, образующие окрашенную область наибольшего размера, были выбраны в качестве потенциальных продуцентов целевых изоферментов (рисунок 5).

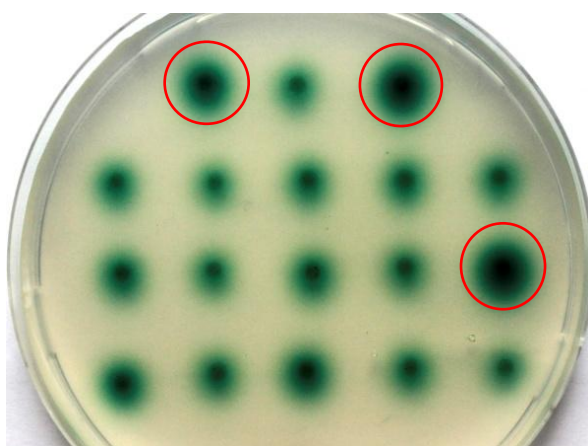


Рисунок 5 - Пример отбора штаммов *P. canescens* – продуцентов минорных изоферментов лакказ. Выбранные трансформанты выделены красным.

Отобранные трансформанты, продуцирующие целевые изоферменты, культивировали в жидкой питательной среде. Активность целевых изоферментов измеряли спектрофотометрически, используя субстраты ПКХ и АБТС. Наибольшая лакказная активность была показана для штаммов, содержащих плазмиды с неинтронированными последовательностями целевых генов. Таким образом, для дальнейшего изучения были выбраны наиболее активные штаммы из этой группы (таблица 2).

Для продуцентов *rLacC*, *rLacD* и *rLacF* (условно обозначены как «высокопродуктивные») максимальная активность соответствующих изоферментов была существенно выше по сравнению с активностями

продуцентов rLacB, rLacE и rLacG (условно обозначены как «низкопродуктивные»). При этом активности «высокопродуктивных» штаммов были на уровне ранее полученного продуцента rLacA (~4-6 усл.ед./мл по ПКХ).

Таблица 2 - Активность отобранных штаммов. Цветом выделены штаммы, выбранные для дальнейшей работы

Ген	Название штамма	Активность, усл. ед./мл	
		по ПКХ	по АБТС
«Высокопродуктивные»			
<i>lacC</i>	<i>P.canescens</i> Cc1(25)5	3	92
	<i>P.canescens</i> Cc1(25)24	6,1	176
	<i>P.canescens</i> Cc1(25)25	6,5	190
<i>lacD</i>	<i>P.canescens</i> Dc2(6)20	2	78
	<i>P.canescens</i> Dc2(6)22	2,4	89
	<i>P.canescens</i> Dc2(6)23	3,44	104
<i>lacF</i>	<i>P.canescens</i> Fc3(5)2	4,8	72
	<i>P.canescens</i> Fc3(5)22	6,2	144
	<i>P.canescens</i> Fc3(5)27	6,5	150
«Низкопродуктивные»			
<i>lacB</i>	<i>P.canescens</i> Bc2(6)2	0	1
	<i>P.canescens</i> Bc2(6)22	0	1,5
	<i>P.canescens</i> Bc2(6)23	0	1
<i>lacE</i>	<i>P.canescens</i> Ec2(8)13	0	0,1
	<i>P.canescens</i> Ec2(8)22	0	0,25
	<i>P.canescens</i> Ec2(8)28	0	0,2
<i>lacG</i>	<i>P.canescens</i> Gc2(4)9	0,14	4,5
	<i>P.canescens</i> Gc2(4)12	0,12	3,2
	<i>P.canescens</i> Gc2(4)19	0,11	2

Для отобранных трансформантов был проведен анализ транскрипции целевых генов (рисунок 6).

Полученные результаты показали наличие экспрессии всех целевых генов, но на разном уровне. Наибольшая экспрессия наблюдалась для генов *lacC* и *lacE*, однако при этом лакказная активность в КЖ продуцента rLacC была существенно выше, чем активность в КЖ продуцента rLacE. Наименьшая экспрессия была показана для генов *lacB* и *lacG*, причем для продуцентов этих изоферментов также была показана низкая лакказная активность в КЖ.

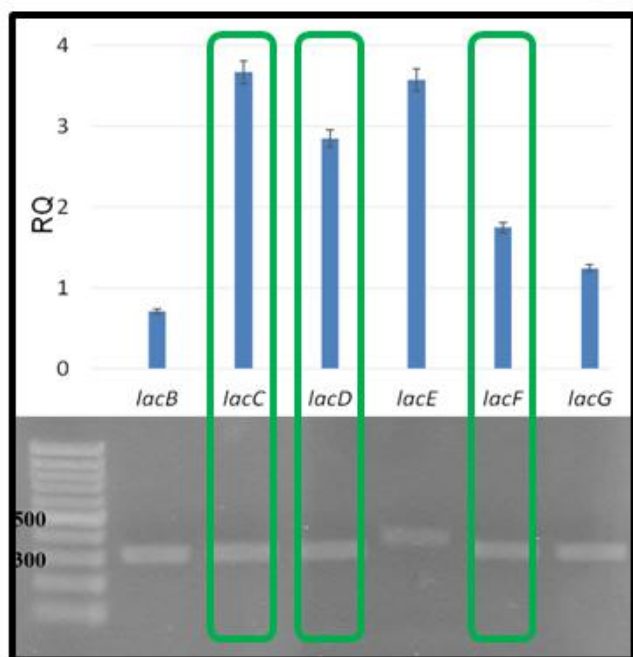


Рисунок 6 – Анализ транскрипции генов, кодирующих изоферменты лакказ: сверху - уровни транскрипции целевых генов, определенные в штаммах *P. canescens* с помощью ПЦР-РВ относительно генов внутреннего контроля (*gpdA*, GenBank:GQ996946 и *actA*, GenBank:MH421959); внизу - электрофоретический анализ ПЦР-фрагментов, полученных с кДНК.

Таким образом, можно сделать вывод, что с точки зрения экспрессии целевых изоферментов (получение мРНК-копий) выбранная экспрессионная система на основе *P. canescens* является в достаточной мере эффективной.

Продолжительность культивирования рекомбинантных штаммов. С целью определения оптимальной продолжительности культивирования рекомбинантных штаммов для выделения целевых ферментов было проведено изучение кинетики их ферментативных активностей (рисунок 7).

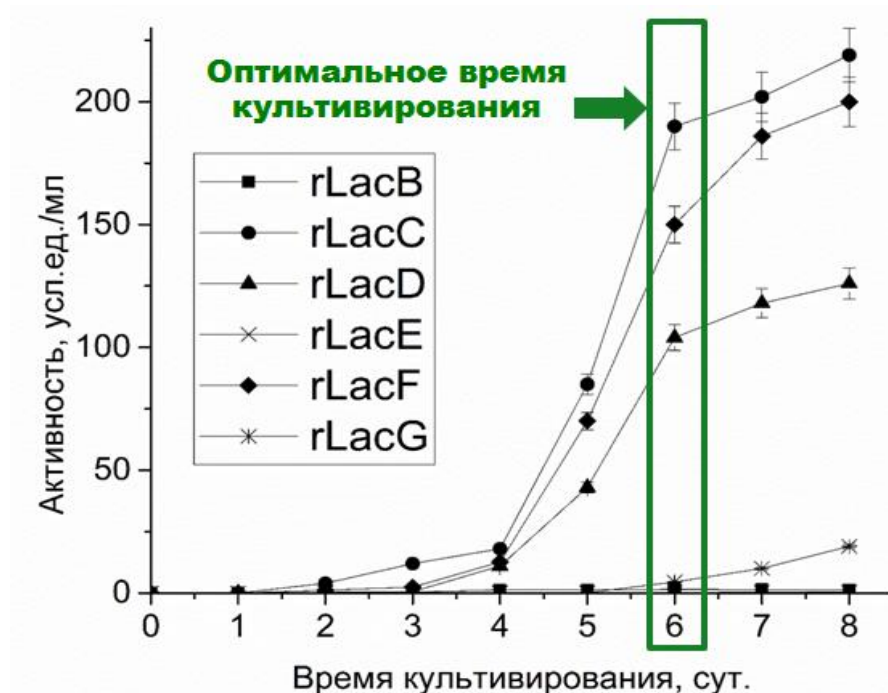


Рисунок 7 - График зависимости ферментативной активности штаммов от времени культивирования. В качестве субстрата использован АБТС.

Для rLacC, rLacD и rLacF наблюдалось существенное увеличение активности после 4 суток культивирования вплоть до 8 суток. Однако после 6 суток культивирования у штаммов наблюдался интенсивный автолиз клеток, поэтому в качестве оптимального времени культивирования продуцентов для выделения целевых изоферментов было выбрано 6 суток (144 ч). Для rLacB, rLacE и rLacG активность сохранялась на низком уровне в течение всего периода культивирования.

Таким образом, только для продуцентов rLacC, rLacD и rLacF была показана достаточная продукция целевых секретируемых изоферментов лакказ, поэтому в дальнейшей работе мы использовали штаммы *P. canescens* Cc1(25)25, *P. canescens* Dc2(6)23 и *P. canescens* Fc3(5)27 для выделения соответствующих изоферментов.

3. Выделение рекомбинантных минорных изоферментов лакказ

При выделении рекомбинантных изоферментов rLacC, rLacD и rLacF из КЖ гриба *P. canescens* была использована схема очистки, разработанная ранее для выделения изофермента LacA из КЖ *T. hirsuta* 072 и rLacA из КЖ *P. canescens* (схема №1). Схема №1 включала следующие стадии: высаливание белка раствором сульфата аммония, ИОХ на носителе DEAE-целлюлоза, ИОХ на носителе DEAE-Toyopearl 650M, ГПХ на носителе Superdex 75. Однако из-за интенсивной пигментации препарата rLacF для его очистки была введена дополнительная стадия ГХ с использованием носителя Phenyl-Sepharose. В результате выход гомогенных препаратов рекомбинантных изоферментов составил 21,6%, 7,4% и 3% для rLacC, rLacD и rLacF соответственно (от общей активности изоферментов в исходной КЖ), что сравнимо с литературными данными. Удельные активности полученных препаратов минорных лакказ по ПКХ составили 260,3 ед./мг, 40 ед./мг и 41 ед./мг для rLacC, rLacD и rLacF соответственно. Таким образом, полученные результаты показали, что использованная схема очистки не оптимальна для изоферментов rLacD и rLacF. Поэтому схема очистки этих изоферментов была изменена. Схема №2 включала следующие стадии: ультрафильтрация КЖ в тангенциальном потоке на целлюлозной мембране, ИОХ на носителе Source 15Q, ГХ на носителе Source 15ISO. Изменение схемы очистки позволило сократить количество стадий очистки изоферментов rLacD и rLacF, при этом их выход увеличился до 12% и 13% (от общей активности изоферментов в исходной КЖ) соответственно. Также удалось повысить удельную активность полученного изофермента rLacD до 63 ед./мг. Удельная активность rLacF не изменилась. Соответствие полученных изоферментов заявленным было подтверждено масс-спектрометрическим анализом MALDI-TOF/TOF MS.

Спектральные свойства изоферментов лакказ. Для определения наличия в молекуле фермента иона меди первого типа и бинарного комплекса ионов меди третьего типа был проведен спектрофотометрический анализ изоферментов (рисунок 8).

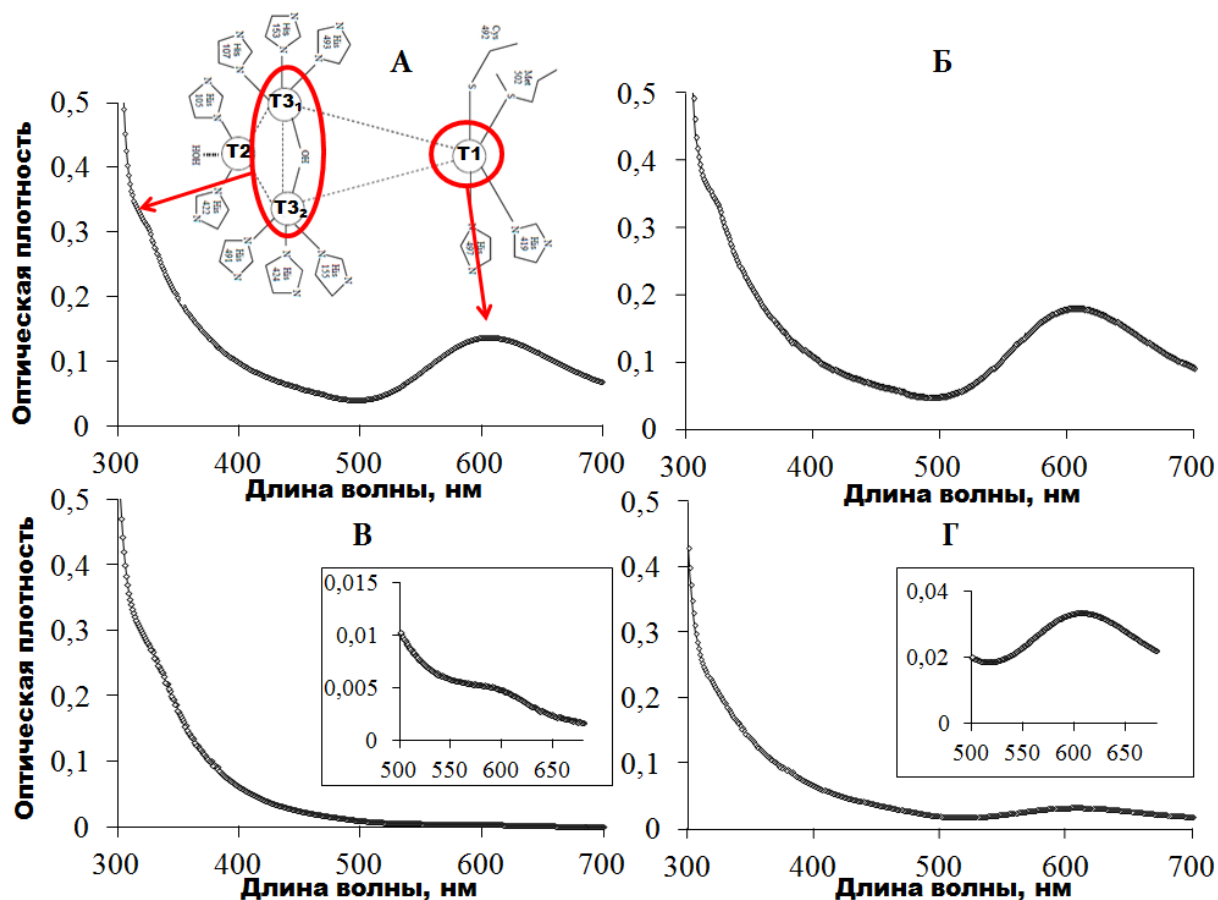


Рисунок 8 - Оптические спектры изоферментов лакказ: А- LacA (контроль), Б- rLacC, В- rLacD, Г- rLacF

Показано, что полученные изоферменты rLacC и rLacF обладают типичными для лакказ оптическими спектрами поглощения, в отличие от спектра rLacD. Аналогично LacA (рисунок 8А), спектры rLacC и rLacF (рисунок 8Б и 8Г) имеют пики поглощения в районе 610 нм и «плечо» при 340 нм, однако для rLacF пик в районе 610 нм менее выражен. Спектр rLacD также имеет «плечо» при 340 нм, однако пик в районе 610 нм практически отсутствует. Ферменты с подобными спектральными характеристиками были обнаружены у различных базидиомицетов, в том числе рода *Trametes*. Некоторые авторы отмечают, что отсутствие спектрального максимума в районе 610 нм может указывать на частичную утрату меди I типа молекулами белка в процессе очистки. Однако следует отметить, что характер спектров изоферментов rLacD и rLacF не менялся при изменении схемы очистки.

4. Сравнительная характеристика свойств изоферментов лакказ

Биохимические свойства изоферментов. Молекулярную массу изоферментов определяли с помощью SDS-ЭФ, ИЭТ – с помощью изоэлектрофокусирования (рисунок 9).

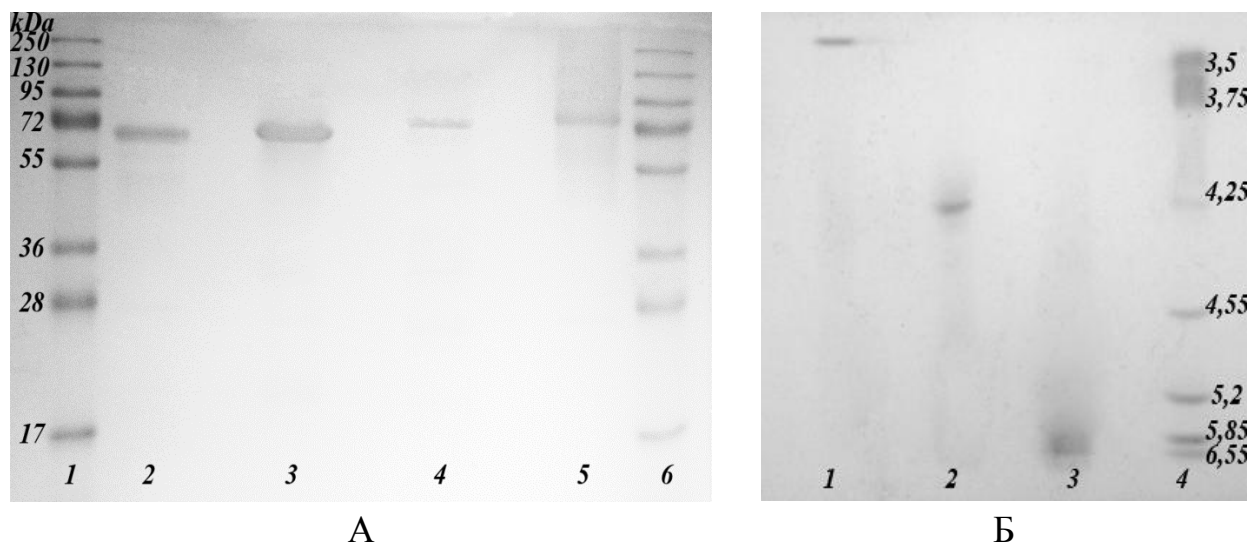


Рисунок 9 – Электрофоретический анализ препаратов лакказ. А - SDS-электрофорез в денатурирующих условиях (1,6-маркер, 2-контрольный образец LacA, 3-rLacC, 4-rLacF, 5-rLacD); Б - изоэлектрофокусирование изоферментов лакказ (1-rLacC, 2-rLacF, 3-rLacD, 4-маркер).

Для изоферментов были определены оптимальные значения pH (рисунок 10) и температуры (рисунок 11), а также их термостабильность в диапазоне 60-75°C. На рисунке 12 в качестве примера приведены данные, характеризующие процесс инактивации изоферментов при температуре 60°C. Основные биохимические характеристики изоферментов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Свойства минорных рекомбинантных изоферментов

Характеристика	rLacC	rLacD	rLacF
М.м., кДа	67	75	70
Степень гликозилирования, %	17	23	20
Количество предсказанных сайтов гликозилирования	11	10	5
ИЭТ	3,1	6,5	4,2
pH-оптимум (по ПКХ)	5,0-5,3	3,8-4,5	5,0
Температурный оптимум, °С (по ПКХ)	60	75	55-70
Термостабильность при 60 °С ($\tau_{1/2}$), мин (по АБТС)	4±2	22±2	12±2

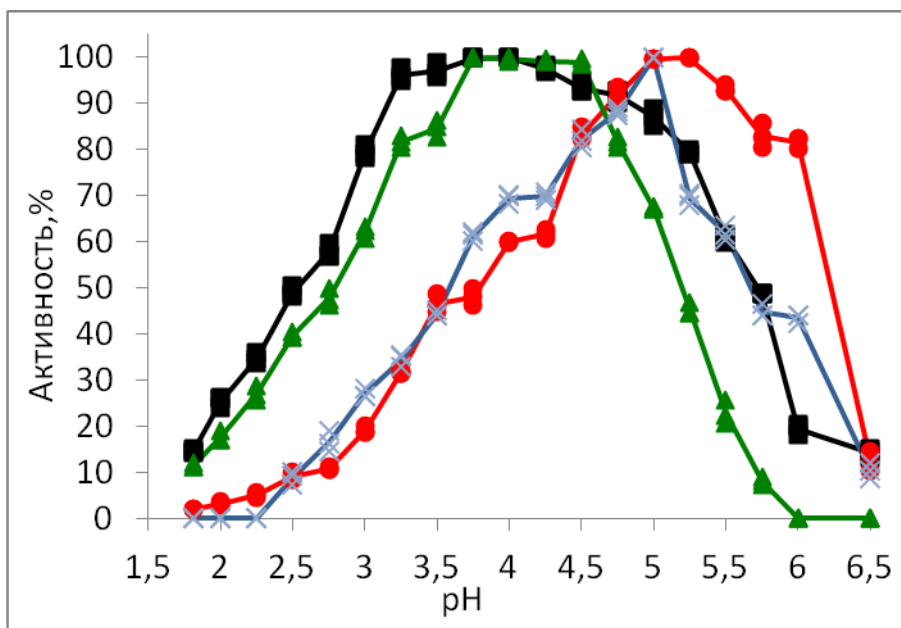


Рисунок 10 -
Графики
зависимости
активности
изоферментов
лакказ от pH
(субстрат – ПКХ).
Обозначения:
■- LacA, ●-rLacC,
▲- rLacD, ×-rLacF

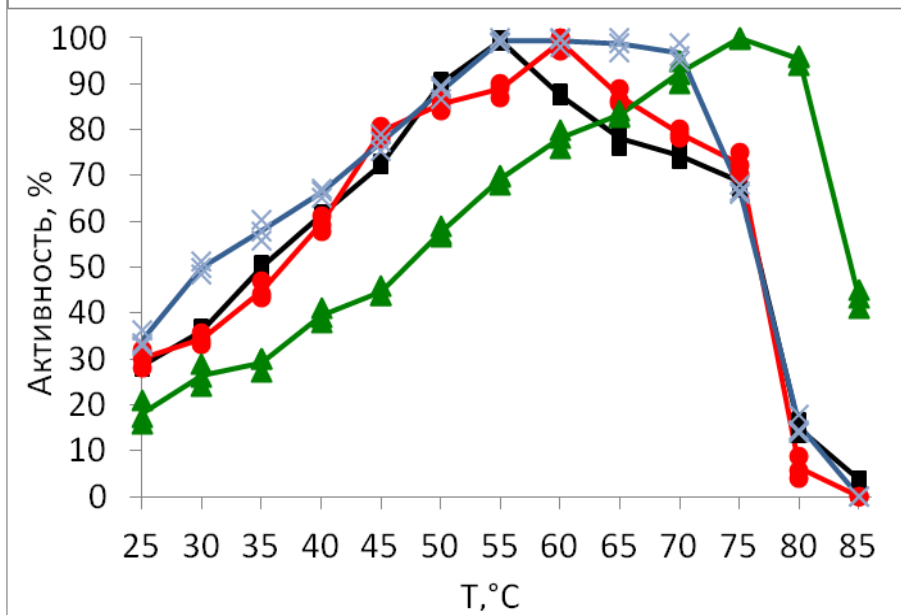


Рисунок 11 -
Графики
зависимости
активности
изоферментов
лакказ от
температуры
(субстрат – ПКХ).
Обозначения:
■- LacA, ●-rLacC,
▲- rLacD, ×-rLacF

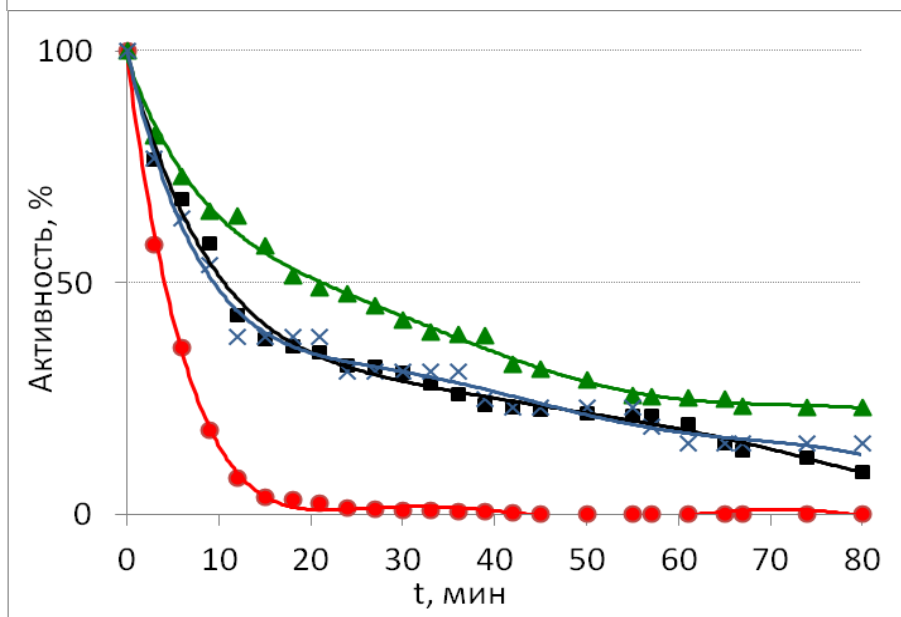


Рисунок 12 –
Уменьшение
активности
изоферментов при
температуре 60°C
(субстрат – АБТС).
Обозначения:
■- LacA, ●-rLacC,
▲- rLacD, ×-rLacF

Показано, что три новых изофермента имеют разные молекулярные массы, которые отличаются от предсказанных, что свидетельствует об их гликозилировании. Наибольшей степенью гликозилирования обладает rLacD (~23%). Этот изофермент также характеризуется наименее кислой ИЭТ (6,5) по сравнению с остальными. Изофермент rLacC, напротив, имеет наиболее кислую ИЭТ (3,1).

Полученные оптимальные значения рН хорошо соотносятся с данными для большинства изученных изоферментов лакказы из разных источников, оптимум рН которых для фенольных субстратов лежит в области от 2,5 до 5,0 (рисунок 10). Изучение зависимости активности лакказы от температуры показало, что изофермент rLacD имеет наиболее высокий температурный оптимум активности (75°C) по сравнению с остальными изоферментами (рисунок 11). При изучении температурной стабильности наибольшая разница в скорости термоинактивации между изоферментами была заметна при 60°C (рисунок 12). Самым стабильным в этом случае оказался изофермент rLacD ($\tau_{1/2}=22\pm 2$ мин), наименее стабильным - rLacC ($\tau_{1/2}=4\pm 2$ мин), скорость инактивации изоферментов LacA и rLacF практически совпадала.

Изучение аминокислотных последовательностей изоферментов позволило выявить отличия в количестве и расположении потенциально возможных сайтов N-гликозилирования изоферментов. По наличию углеводных остатков в пептидах, идентифицированных MALDI-TOF/TOF MS анализом, было подтверждено присутствие таких уникальных сайтов гликозилирования, как Asn²⁰⁷ и Asn²⁹² для rLacC и rLacD соответственно.

Таким образом, 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.

Оценка ОВП изоферментов. Для оценки ОВП минорных изоферментов проводили тест на обесцвечивание красителя азура Б в присутствии медиатора 1-гидроксибензотриазола (ГБТ) (рисунок 13).

Изменение цвета красителя азура Б при использовании rLacC наблюдалось только после 72 ч воздействия фермента и было несущественным, что свидетельствует о значительно более низком ОВП этого изофермента по сравнению с LacA (ОВП=780 мВ), который полностью окисляет азур Б в течение 24 ч. Значения ОВП rLacD и rLacF занимают промежуточное положение между ОВП LacA и rLacC, так как изменение цвета красителя начиналось между 24 и 48 ч экспозиции субстрата с этими изоферментами.

Таким образом, ОВП изоферментов лакказы *T. hirsuta* 072 уменьшается в ряду **LacA>rLacF>rLacD>rLacC**.

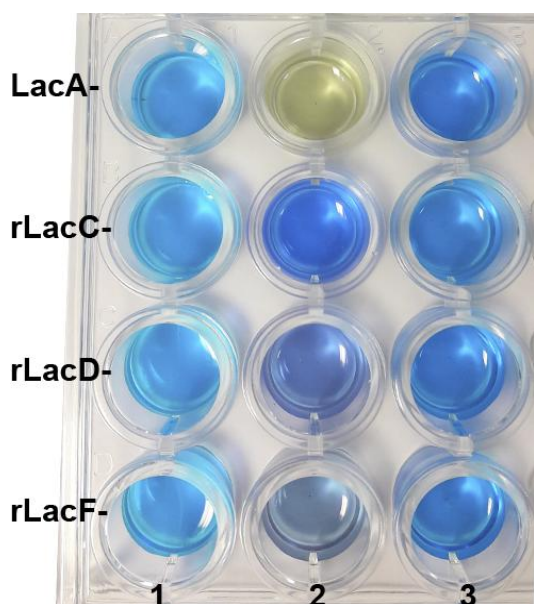


Рисунок 13 - Обесцвечивание красителя азура Б изоферментами в присутствии медиатора ГБТ после 96 ч инкубирования.

- 1- Азур Б+ГБТ,
- 2- Азур Б+ГБТ+фермент,
- 3- Азур Б+фермент

Каталитические свойства изоферментов. Для минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* были определены кинетические константы по 6 субстратам: пирокатехин (ПКХ), 2,6-диметоксифенол (ДМФ), феруловая кислота (ФК), синаповая кислота (СинК), гваякол (ГВ) и АБТС (таблица 4). Полученные значения сравнивали со значениями, полученными ранее для LacA.

Из всех использованных субстратов гваякол и пирокатехин окислялись всеми изоферментами с наименьшей эффективностью, что характерно для базидиальных лакказ. Наиболее эффективно все изоферменты окисляли синаповую кислоту, что объясняется высокой афинностью изоферментов к этому субстрату. Можно отметить, что в отличие от мажорного изофермента LacA, для которого все каталитические константы по АБТС и синаповой кислоте близки, минорные изоферменты окисляли нефенольный АБТС с меньшей эффективностью.

Среди минорных изоферментов, rLacD наиболее эффективно окислял фенольные субстраты синрингильного типа и пирокатехин, а rLacF наиболее эффективно окислял субстраты гваяцильного типа и нефенольный АБТС. Можно также выделить интересную особенность rLacD: для фенольных субстратов синрингильного типа (ДМФ и СинК) этот фермент имеет несколько бóльшую афинность к этим субстратам по сравнению с мажорным LacA, однако эффективность окисления субстратов ниже, чем у LacA. Изофермент rLacC выделяется тем, что в отличие от остальных изоферментов, которые обладали наибольшей афинностью к обоим субстратам синрингильного типа, его

аффинность к феруловой кислоте (субстрат гваяцильного типа) больше, чем к ДМФ.

Таблица 4 - Каталитические константы изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072

Суб-страт	Константа	Изофермент			
		LacA*	rLacC	rLacD	rLacF
АБТС	$K_M, \mu\text{M}$	17 ± 2	534 ± 33	37 ± 2	88 ± 6
	k_{cat}, c^{-1}	225 ± 17	155 ± 15	1,6 ± 0,1	76 ± 6
	$k_{cat}/K_M, \text{c}^{-1} \text{mM}^{-1}$	13235	290	44	860
ПКХ	$K_M, \mu\text{M}$	183 ± 16	16299 ± 1719	280 ± 21	3627 ± 566
	k_{cat}, c^{-1}	302 ± 27	204 ± 2	23,0 ± 0,2	74 ± 6
	$k_{cat}/K_M, \text{c}^{-1} \text{mM}^{-1}$	1650	13	82	20
ДМФ	$K_M, \mu\text{M}$	24 ± 2	589 ± 75	17 ± 1	79 ± 10
	k_{cat}, c^{-1}	128 ± 11	57 ± 5	10 ± 1	36 ± 2
	$k_{cat}/K_M, \text{c}^{-1} \text{mM}^{-1}$	5333	97	590	452
СинК	$K_M, \mu\text{M}$	17 ± 2	71 ± 14	5 ± 1	33 ± 9
	k_{cat}, c^{-1}	324 ± 31	190 ± 18	30 ± 3	123 ± 10
	$k_{cat}/K_M, \text{c}^{-1} \text{mM}^{-1}$	19059	2665	5948	3748
ФК	$K_M, \mu\text{M}$	28 ± 3	173 ± 38	78 ± 13	118 ± 16
	k_{cat}, c^{-1}	270 ± 25	70 ± 6	24 ± 2	72 ± 6
	$k_{cat}/K_M, \text{c}^{-1} \text{mM}^{-1}$	9643	403	309,2	613
ГВ	$K_M, \mu\text{M}$	173 ± 15	15742 ± 337	931 ± 64	2766 ± 368
	k_{cat}, c^{-1}	162 ± 10	216 ± 18	7,0 ± 0,5	42 ± 4
	$k_{cat}/K_M, \text{c}^{-1} \text{mM}^{-1}$	976	14	8	15

*(Glazunova *et al.*, 2018)

Субстратная специфичность изоферментов. В качестве субстратов для исследования субстратной специфичности было использовано 16 соединений - типичных субстратов лигнолитических ферментов, а также ксенобиотиков (таблица 5). Способность изоферментов к модификации субстратов оценивалась спектрофотометрически.

Таблица 5 - Результаты скрининга субстратной специфичности изоферментов. Обозначения: «+++» - явные изменения в спектрах относительно контроля; «+» - видимые изменения; «+/-» - умеренные видимые изменения, «-/+» - практически без изменений; «-» - отсутствие изменений. LacA использован в качестве контроля.

Группа	Субстраты	Изоферменты			
		LacA	rLacC	rLacD	rLacF
Ароматические карбоновые кислоты	<i>n</i> -Кумаровая кислота	++	++	-	++
	Феруловая кислота	++	++	+	++
	Галловая кислота	++	++	++	++
	Сиреневая кислота	++	++	++	++
	Ванильная кислота	++	+	+/-	+
Ароматические спирты	Вератровый спирт	-	-	-	-
	Орцинол	++	+/-	+/-	+
	Гваякол	++	++	++	++
Ароматические альдегиды	Ванилин	++	-/+	+	++
Ароматические амины	2,5-Ксилидин	++	-/+	++	+
	<i>o</i> -Толуидин	++	-/+	+	+
Синтетические красители и гербициды	Конго красный	++	-/+	+	+
	Индигокармин	++	+	+	+
	Бромкрезоловый зеленый	++	++	++	++
	Атразин	-/+	-/+	-	-
	Глин	-	-	-	-

Была выявлена интересная особенность изофермента rLacD по отношению к некоторым субстратам из группы *ароматических карбоновых кислот*. Особенность заключалась в сниженной способности изофермента к окислению феруловой кислоты, а также в неспособности модифицировать *n*-кумаровую кислоту, которая является типичным субстратом для грибных лакказ. Примечательно, что снижение (или полное отсутствие) окислительной способности в отношении этих субстратов характерно для лакказы аскомицета *M. thermophila*, а также для растительных и бактериальных лакказ.

Все минорные изоферменты показали пониженную способность к модификации ванильной кислоты по сравнению с мажорным изоферментом, что, вероятно, связано с более низкими ОВП этих ферментов.

Минорные ферменты также показали пониженную способность к модификации орцинола (из группы *ароматических спиртов*) по сравнению с LacA.

Изофермент γ LacC отличался самой низкой эффективностью модификации всех использованных субстратов группы *ароматических альдегидов и аминов*. Интересно, что этот изофермент характеризовался самой слабой способностью к модификации ароматических соединений, содержащих аминогруппу. Это подтверждается и в *группе синтетических красителей и гербицидов*, где этот фермент также слабо окислял конго красный, содержащий аминогруппы. Кроме того, в этой группе соединений изоферменты γ LacD и γ LacF показали неспособность к модификации гербицида атразина (хлортриазин).

Таким образом, основываясь на данных, полученных при характеристике минорных изоферментов лакказ, можно сделать вывод, что минорный γ LacF является наиболее близким к мажорному LacA по своим свойствам и субстратной специфичности, остальные изоферменты имеют ряд отличительных особенностей и, вероятно, имеют разное функциональное назначение. Эти особенности могут быть полезными с точки зрения биотехнологического применения новых изоферментов.

5. Оценка возможности применения изоферментов лакказ на примере обесцвечивания красителей

Поскольку лакказы грибного происхождения потенциально способны к деградации различных ксенобиотиков, в том числе красителей, и широко востребованы для детоксикации сточных вод, в нашей работе была проверена активность изоферментов лакказ по отношению к деградации четырех широко используемых красителей: конго красный (группа азокрасителей), индигокармин (индигоидная группа), бромфеноловый синий и феноловый красный (трифенилметановая группа). Так как лакказы в индивидуальном виде не всегда способны эффективно модифицировать ксенобиотики, были выбраны наиболее перспективные медиаторы: синтетические (АБТС и ГБТ), фенольные (ванилин, синаповая кислота, феруловая кислота) и неорганические (октацианолибдат калия, $K_4Mo(CN)_8$ и ферроцианид калия, $K_4Fe(CN)_6$). Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 14.

Можно видеть, что полученные результаты по обесцвечиванию красителей в отсутствие медиаторов не всегда коррелируют со значениями ОВП минорных изоферментов. Так, γ LacC, имеющий самый низкий ОВП, окислял феноловый красный быстрее, чем более высокопотенциальные γ LacD и γ LacF. Кроме того, было обнаружено, что изоферменты γ LacD и γ LacF проявляли наибольшую эффективность деградации красителя конго красного по сравнению с остальными изоферментами: γ LacD в присутствии АБТС или $K_4Mo(CN)_8$, а γ LacF только в присутствии АБТС в качестве медиатора. Кроме

того, в присутствии АБТС эти же изоферменты за 24 ч практически полностью деградировали краситель феноловый красный, в отличие от остальных изоферментов.

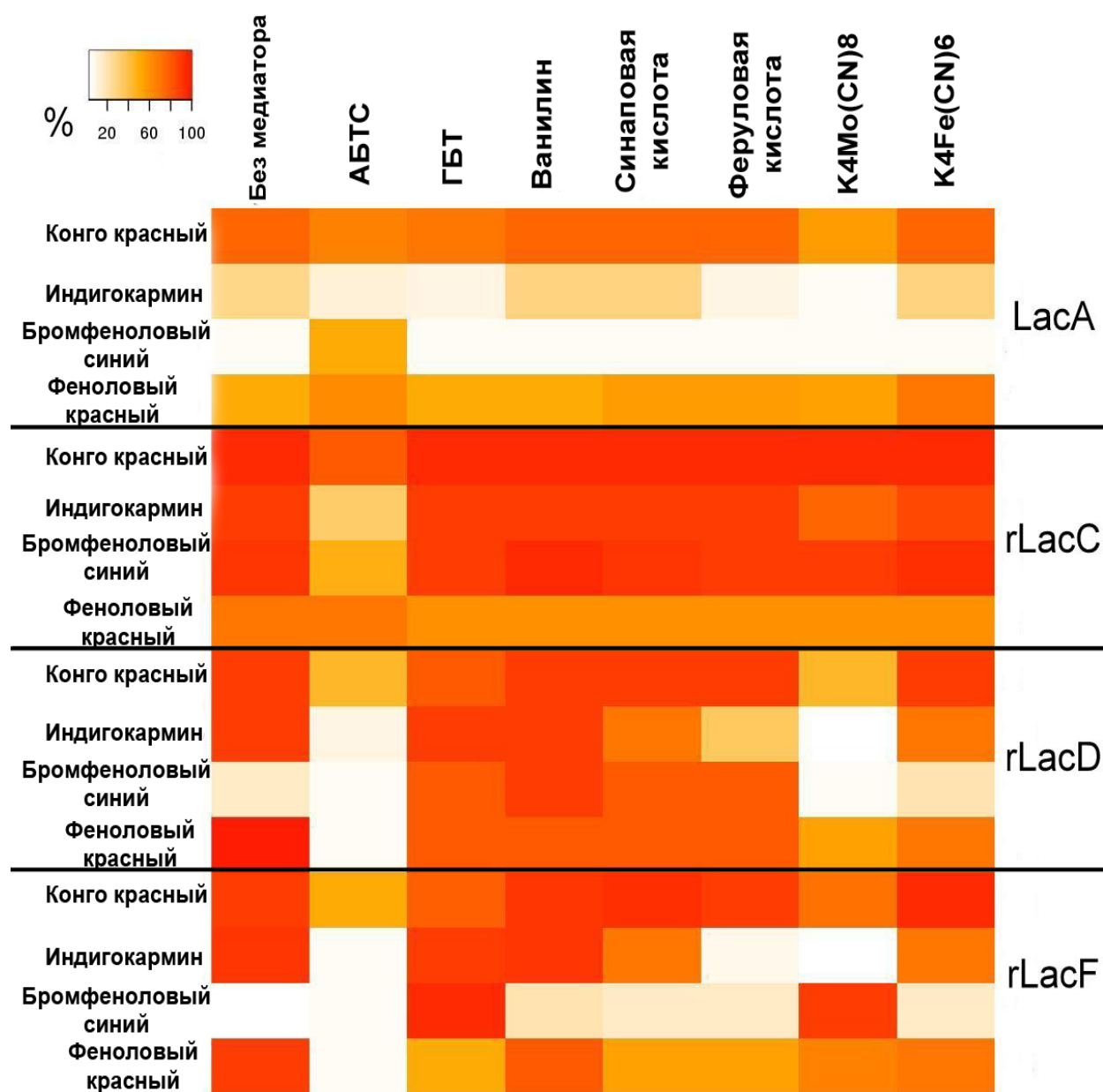


Рисунок 14 – Карта обесцвечивания красителей после 24-часовой обработки изоферментами лакказ *T. hirsuta* 072 с применением редокс-медиаторов (степень деградации красителя: 1-25 % – хорошо заметное обесцвечивание, 25-50% – видимое обесцвечивание, 50-75% – небольшое изменение цвета, 75-100% – без существенных изменений)

Таким образом, минорные изоферменты rLacD и rLacF, несмотря на более низкий ОВП по сравнению с мажорным LacA, в сочетании с медиаторами более эффективно деградируют красители конго красный и феноловый красный. При

этом наиболее подходящими медиаторами для обесцвечивания красителей является АБТС и $K_4Mo(CN)_8$. Можно заключить, что изоферменты rLacD и rLacF можно позиционировать как наиболее перспективные с точки зрения применения их в составе ЛМС для защиты окружающей среды или в биотехнологии.

ВЫВОДЫ

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.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

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. doi: 10.1002/bab.1160
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. doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.013
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. doi: 10.1134/S0003683818090090
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

Материалы научных 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., Синицын 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.