

Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии им. А.Н.Баха  
Российской академии наук

119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр.2  
Тел.. 954-52-83, факс: 954-27-32

29.09.2014 № 12507-271-503  
на № 1285/104-03 от 03.09.2014

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт биохимии им. А.Н. Баха  
Российской академии наук,  
д.х.н., профессор



Б.Б. Дзантиев

«29» сентября 2014г

#### ОТЗЫВ

ведущей организации - Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук на диссертационную работу Панина Николая Владимировича «Направленный мутагенез пенициллинацилазы из *Escherichia coli* для изменения каталитических свойств и стабильности», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.15 – кинетика и катализ, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

*Актуальность работы.* Диссертационная работа Панина Н.В. посвящена белковой инженерии пенициллинацилазы из *Escherichia coli*. Данный объект представляет собой значительный практический интерес с большим потенциалом использования в тонком органическом синтезе при проведении реакций ацилирования аминсоединений в водной среде. Данный фермент способен проводить хемо-, регио- и стереоселективные превращения с высокой каталитической активностью для широкого круга аминсоединений, что находит свое применение при получении бета-лактамовых антибиотиков, пептидном синтезе, а также разделении рацематов неприродных аминокислот и др. Однако практическое использование фермента ограничивают такие проблемы как низкая эффективность в реакции синтеза, недостаточная стереоселективность к первичным аминам и аминспиртам, низкая стабильность в области высоких значений pH и при использовании высоких концентраций реагентов. В связи с этим в диссертационной работе Панина Н.В. была сделана попытка обнаружить и характеризовать мутации, приводящие к улучшению каталитических свойств и стабильности фермента в рассматриваемых системах. С учетом вышесказанного

необходимо признать, что тема диссертационной работы Панина Н.В. является весьма актуальной.

*Содержание работы:* Диссертация изложена на 200 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, списка литературы (151 источник), и приложений), которые включают 67 таблиц, 5 схем, 76 рисунков и 2 диаграммы.

Материал диссертации изложен ясно и логично, хорошо иллюстрирован и структурирован.

Во введении кратко обосновывается выбор темы исследования, цель работы, задачи исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В главе 1, посвящённой обзору литературы и постановке задачи, рассмотрены современные представления об объекте исследования, его ближайших гомологах и последние тенденции в исследованиях по белковой инженерии пенициллинацилазы.

В главе 2 подробно описаны материалы и методы, которые автор использовал в диссертационной работе.

В главе 3 изложены результаты исследований. В первой части (пп.3.1-3.7) в общих чертах представлена вся совокупность экспериментальных данных и их корреляционный анализ. Во второй части (пп.3.8-3.11) автор переходит от общего к частному и рассматривает каждую группу эффектов в отдельности в зависимости от мутации. При этом проводится всестороннее описание и анализ полученных экспериментальных данных. Для основных эффектов на основании структурного анализа и молекулярного моделирования предложены возможные механизмы стабилизации фермента. Составлены рекомендации по дальнейшему использованию мутаций.

В главе «Основные результаты и выводы» в сжатом виде подведены основные итоги работы.

В главе «Приложения» содержатся материалы и текст программы по моделированию реакции ферментативного ацильного переноса в водной среде, которые могут быть весьма полезны при дальнейшей работе в данном направлении.

Наиболее значимыми научными результатами, полученными в диссертационной работе Панина Н.В. является улучшение таких важных каталитических свойств пенициллинацилазы как эффективность ацильного переноса на ядро пенициллинов при получении так называемых полусинтетических аналогов, увеличение энантиоселективности по отношению к аминокспиртам в реакции их ферментативного

ацилирования в водной среде при разделении рацематов, а также увеличение стабильности фермента к инактивирующему воздействию высоких концентраций субстратов при проведении синтеза пептидов путем введения точно выбранной одиночной мутации. Все отмеченные результаты важны с точки зрения препаративного биокаталитического синтеза и достигаются при введении ограниченного числа мутаций, что весьма удобно с практической точки зрения и должно позволить относительно легко производить нужные варианты фермента в необходимом количестве и создать технологические формы биокатализаторов. Следует также отметить, что степень улучшения принципиально важных каталитических свойств и стабильности пенициллинацилазы из *Escherichia coli* превышает эффекты, описанные в литературе, и основные научные результаты диссертационной работы являются приоритетными.

Диссертационная работа Панина Н.В. является законченным комплексным междисциплинарным научным исследованием, выполненным на стыке нескольких дисциплин: биокатализа, генетической инженерии, биотехнологии, тонкого органического синтеза, физической и аналитической химии. Выводы, сделанные в диссертационной работе, адекватно отражают полученные результаты.

*Научная новизна и практическая значимость исследования:* Все экспериментальные результаты, полученные автором в работе, являются новыми. Основным достижением данной работы является получение информации о новых мутациях, которые могут существенно улучшить функциональные свойства фермента дикого типа, что может найти применение при практическом использовании биокатализатора для нужд тонкого органического синтеза, а также служить основой для новых структурно-функциональных исследований фермента с точки зрения фундаментальной энзимологии.

Впервые для пенициллинацилазы показано существенное влияние мутаций на операционную стабильность, а также получен активный мутант по консервативному каталитическому серину, установлена корреляция между активностью фермента к хромогенному субстрату и эффективностью синтеза N-ацильных производных аминокислот в водной среде.

Большую практическую значимость представляет целый ряд полезных мутаций пенициллинацилазы, обнаруженные Н.В. Паниным: мутации bF256R и aR145G, приводящие к существенному увеличению эффективности синтеза, мутация bF71A, приводящая к значительному увеличению стереоселективности, а также мутация bD484N, приводящая к увеличению щелочной и операционной стабильности.

*Публикации:* Основные результаты исследований, полученные в ходе выполнения диссертации, представлены в 4 статьях в рецензируемых научных журналах и в 10 тезисах международных и российских научных конференций и симпозиумов. Поданы 3 заявки на патент, получено 1 решение о выдаче российского патента.

Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации. Сформулированные в работе выводы соответствуют положениям, выносимым на защиту, являются достоверными и не вызывают сомнений. Они полностью подтверждаются экспериментальными данными и убедительно аргументированы.

*Замечания:*

- 1) В главе 3.2, стр. 91 автор называет клоны результатом мутагенеза, хотя более уместно было бы говорить о плазидах с мутацией;
- 2) При представлении полученных результатов автор сосредоточился на представлении эффектов по улучшению свойств и не уделил должного внимания описанию негативных эффектов от вводимых мутаций, которые также имеют важное значение;
- 3) Раздел, посвященный генетической инженерии (глава 3.2, стр. 91-96) не совсем уместен в обсуждении результатов.

Сделанные замечания тем не менее не умаляют достоинств данной работы, которая, несомненно, представляет теоретический и практический интерес.

*Соответствие требованиям:*

По объему, уровню выполнения, новизне и практической значимости диссертационная работа Панина Н.В. отвечает требованиям к кандидатским диссертациям и соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а именно, в работе решена научная задача по поиску новых факторов и мутаций, приводящих к существенному увеличению каталитических свойств и стабильности, а также выявлению новых структурно-функциональных особенностей фермента, имеющая значение для развития биокатализа и ферментативной биотехнологии.

*Рекомендации:*

Результаты данного исследования могут быть использованы в МГУ им. М.В.Ломоносова, ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Институте биохимии имени А.Н.Баха, НИЦ «Курчатовский институт», Институте катализа им.



Г.К.Борескова СО РАН, ОАО «Биосинтез», ЦВТ «Химрар», ООО «Фармапарк», ОАО «Фармстандарт», ОАО «Фарма Био», ООО «Пептос Фарма».

*Заключение:*

Работа представляет собой актуальное исследование, выполненное на высоком научном и экспериментальном уровне с использованием современных методов. Полученные автором результаты могут служить основой для формирования стратегии поиска новых многоточечных мутаций и определения механизма их действия на молекулярном уровне. Выводы и обобщения, сделанные автором, отражают полученные результаты и полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования. Все основные научные положения и выводы достоверны. Автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.15 – кинетика и катализ, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв заслушан и утвержден на совместном семинаре лабораторий химической энзимологии, биотехнологии ферментов, и иммунобиохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, протокол № 1 от «19» сентября 2014 г.

Заведующий лабораторией химической энзимологии ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, профессор, д.х.н.

А.И. Ярополов

