

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Панина Николая Владимировича «Направленный мутагенез пенициллинацилазы из *Escherichia coli* для изменения каталитических свойств и стабильности», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.15 – кинетика и катализ и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Работа Н.В. Панина посвящена рациональному дизайну фермента пенициллинацилазы (ПА) из *E. coli*. Фермент широко используется в фармацевтической промышленности для получения ядер бета-лактамных антибиотиков; ведутся исследования по применению ПА для энантиоселективного ацилирования аминокислот и разделения их рацематов. Вместе с тем ограниченная субстратная специфичность и стереоспецифичность фермента, его низкая стабильность в щелочной среде, а также осложнение реакций синтеза протеканием побочных реакций гидролиза ограничивают более широкое применение фермента, поэтому использование методов белковой инженерии для направленного изменения свойств фермента является важной задачей, и актуальность работы не вызывает сомнений.

Автором были получены и охарактеризованы мутантные формы ПА, обладающие повышенной каталитической активностью, эффективностью синтеза бета-лактамных антибиотиков, стереоселективностью и стабильностью. Улучшение каталитической активности было достигнуто введением компенсирующей замены bS1T + bT68S, в которой увеличение бокового радикала каталитического остатка компенсировалось уменьшением бокового радикала контактирующего с ним остатка b68.

Для повышения эффективности синтеза бета-лактамных антибиотиков автор исследовал замены аминокислотных остатков, расположенных в сайте связывания б-аминопенициллановой кислоты, на остаток аргинина, гуанидиновая группа которого могла бы взаимодействовать с карбоксильной группой кислоты субстрата. Впервые полученная Н.В. Паниным мутация bF256R привела к почти 4-кратному увеличению параметра реакционной способности нуклеофила и почти 2-кратному увеличению стереоселективности фермента в реакции ацилирования 2-аминобутанола амидом R-миндальной кислоты.

Проведенный автором биоинформатический анализ семейства N-концевых гидролаз и данные молекулярного моделирования указали на карбоксил-карбоксилатную пару bD484-bE482,



депротонирование которой при увеличении pH предположительно приводит к разрушению системы водородных связей и дестабилизации структуры фермента. Аминокислотная замена bD484N почти на порядок улучшила стабильность фермента в щелочной среде.

Следует отметить некоторые несущественные замечания к автореферату, ничуть не умаляющие научной ценности работы:

- Не совсем ясна методология моделирования влияния аминокислотных замен на стереоселективность. Неясно, каким образом был проведен т.н. «множественный докинг», и как по его результатам оценивалась разница в свободной энергии связывания.
- Фраза «В отношении термостабильности мутация bF256R приводит к 300-кратному увеличению константы инактивации при 50°C» на стр. 8 противоречит данным таблицы 4, согласно которой константа инактивации увеличилась в 30 раз.
- Автор упоминает о недостаточной стабильности bF256R и посвящает крупный раздел работы улучшению стабильности фермента, но никак не анализирует возможность одновременной замены направленной на улучшение стабильности и синтетической эффективности фермента.

Несмотря на замечания, выполненная Н.В. Паниным работа по своей актуальности, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности и достоверности выводов полностью соответствует всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, и является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развитие соответствующей специальности диссертации области знаний, и ее автор заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.15 – кинетика и катализ и 03.01.06 – биотехнология.

Научный сотрудник,  
ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН  
кандидат химических наук

О.В. Строганов

Подпись н.с. О.В. Строганова заверяю  
Ученый секретарь ИОХ РАН  
кандидат химических наук



И.К. Коршевец