



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

410049, г.Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13.
Тел.: (845-2) 97-04-44, 97-04-03. Факс: (845-2) 97-04-44, 97-03-83.
E-mail: mail@ibppm.ru, http://ibppm.ru
ОКПО 04740828, ОГРН 1026402489013, ИНН/КПП 6451105279/645101001

№ 2322-01-1.4-269 от 01.06.2017г.
на _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук

д.х.н., профессор

С.Ю. Щёголев

«31» мая 2017 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Трубициной Любови Игоревны
«Двухдоменные лакказы бактерий рода *Streptomyces*:
клонирование, экспрессия, характеристика ферментов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Диссертационная работа Трубициной Любови Игоревны посвящена изучению двухдоменных лакказ бактерий рода *Streptomyces*. Лакказа, один из первых ферментов, открытых в истории биохимии, и обнаружены у грибов, высших растений, насекомых, водорослей, лишайников и бактерий. Однако, несмотря на многолетние исследования интерес исследователей к лакказам не ослабевает. Целый ряд уникальных каталитических свойств этих ферментов делает их привлекательными для биотехнологического использования.

Лакказы бактериального происхождения были открыты сравнительно недавно и поэтому недостаточно изучены. Бактериальные лакказы подразделяют на трёхдоменные, структурные аналоги грибных лакказ, и

двухдоменные ферменты. Если количество исследованных грибных лакказ исчисляется сотнями, трёхдоменных бактериальных лакказ – десятками, то число известных двухдоменных лакказ составляет всего семь. Несмотря на ограниченность сведений о двухдоменных бактериальных лакказах, очевидно, что целый ряд полезных свойств делает их востребованными в прикладных разработках. Так, двухдоменные лакказы бактерий часто обладают высокой термостабильностью, способны работать при нейтральном значении рН, устойчивы к действию целого ряда ингибиторов, чем выгодно отличаются от трёхдоменных грибных лакказ. Все вышесказанное определяет несомненную актуальность темы работы.

Научно-практическая значимость работы также не вызывает сомнений. Обнаруженное сочетание высокой термостабильности, низкой субстратной специфичности, способности работать в широком диапазоне значений рН, устойчивости к ингибиторам (азиду и фториду), а также возможности повышения окислительно-восстановительного потенциала лакказ, делают двухдоменные лакказы бактерий привлекательными инструментами в биотехнологических процессах. Новая лакказа *Streptomyces griseoflavus* Ас-993 была защищена патентом (Юревич Л.И. и др., 2015).

Целью диссертационной работы Л.И. Трубициной является получение и характеристика бактериальных двухдоменных лакказ из бактерий – представителей рода *Streptomyces*. Для достижения поставленной цели автором были сформулированы адекватные задачи, которые удалось решить полностью благодаря применению современных методов биоинформационного анализа, молекулярно-генетических и биохимических методов.

Диссертация оформлена по стандартному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 328 источников. Материалы диссертации

изложены на 147 страницах, содержат 22 таблицы и иллюстрированы 41 рисунком.

В обзоре литературы подробно рассматривается характеристика лакказ. Отдельные разделы обзора посвящены детальному описанию классических трёхдоменных лакказ грибного происхождения, трёхдоменных лакказ бактериального происхождения, а также двухдоменных бактериальных лакказ. Особое внимание уделено вопросу происхождения бактериальных двухдоменных лакказ, и описанию применения лакказ различного происхождения. Сведения, представленные в обзоре, грамотно и последовательно изложены, систематизированы автором. Это позволяет сделать вывод о том, что диссертант хорошо осведомлен о состоянии исследований в данной области науки.

В разделах «Результаты исследования» и «Обсуждение результатов» диссертант подробно и точно описывает результаты проведённых экспериментов, раскрывает их содержание. Некоторые результаты заслуживают специального упоминания. Например, анализ геномных последовательностей стрептомицетов с использованием методов биоинформационного анализа, который позволил выявить гены двухдоменных лакказ. Автор провела работу по клонированию и экспрессии генов двухдоменных лакказ в гетерологичной системе (в штамме *Escherichia coli* M15 (pRep4)). Отдельная работа была проведена для оптимизации условий наработки лакказ в штамме *E. coli* M15 (pRep4) для устранения эффекта агрегирования ферментов. Стоит отметить, что выбор в качестве экспрессионного вектора плазмиды pQE-30, позволил получить рекомбинантный белок, сшитый с гистидинами на N-конце, что существенно облегчало процедуру очистки лакказ. Применение электрофореза в полиакриамидном геле в нативных и денатурирующих условиях позволило определить молекулярную массу мономерных форм лакказ, а также доказать, что все три фермента функционально активны в форме гомотримеров. Для полученных препаратов белка автором были исследованы физико-

химические свойства, определены каталитические характеристики. Это позволило провести сравнительную характеристику трех полученных в работе лакказ с известными представителями этой группы ферментов. Было установлено, что все три лакказы более стабильны при щелочных значениях рН, имели спектры поглощения, типичные для всех двухдоменных лакказ (с максимумом при 590 нм и плечом при 330 нм). Температурные оптимумы лакказ были выше значений, известных для других двухдоменных лакказ. Обнаружена высокая термостабильность лакказ из *S. griseoflavus* ВКМ Ас-993 и *S. viridochromogenes* ВКМ Ас-629. Помимо исследования субстратной специфичности и влияния ионов металлов, автор подробно исследовала влияние ингибиторов на активность лакказ в кислых и щелочных условиях. Было установлено, что азид натрия и фторид натрия – сильные ингибиторы трёхдоменных грибных и бактериальных лакказ, не снижали активность двухдоменных лакказ при щелочных значениях рН, а при кислых значениях остаточная активность лакказ наблюдалась даже при концентрации ингибиторов 100 мМ. Для выявления причин такого эффекта автором была проведена работа по кристаллизации двухдоменных бактериальных лакказ, в том числе были получены кристаллы фермента с ингибитором (азидом натрия). Проведен рентгеноструктурный анализ кристаллов двухдоменных лакказ и, на основании полученных дифракционных данных, рассчитаны пространственные модели этих ферментов. На примере трёхмерной структуры двухдоменной лакказы из *S. viridochromogenes* ВКМ Ас-629 был проведен сравнительный анализ с трёхмерной структурой трёхдоменной лакказы гриба *Trametes versicolor*. Было впервые обнаружено, что субстратный канал у двухдоменной лакказы заметно уже, чем у трёхдоменной лакказы. Аминокислоты, формирующие стенки канала у грибной лакказы представлены неполярными остатками, а у бактериальной – полярными и отрицательно-заряженными. Диссертантом была предложена гипотеза, объясняющая, как в щелочных условиях полярные и отрицательно-заряженные аминокислоты приобретают отрицательный заряд и

препятствуют проникновению азид- и фторид-ионов к активному центру фермента. Именно связывание азид-иона с активным центром фермента приводит к ингибированию лакказы. Анализ кристаллов лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) ВКМ Ас-1709 с азидом натрия показал, что азид не связывался с активным центром фермента. Невозможность связывания ингибитора с активным центром фермента в щелочных условиях автор объясняет природой аминокислот субстратного канала двухдоменной лакказы.

Известно, что двухдоменные бактериальные лакказы обладают сравнительно низким окислительно-восстановительным потенциалом. Показанная в работе низкая окислительная активность двухдоменных лакказ стрептомицетов в отношении фенольных соединений подтверждает это явление. Для повышения окислительно-восстановительного потенциала двухдоменных лакказ в составе пары лакказа/медиатор был проведен поиск подходящего медиатора из числа известных медиаторов трехдоменных лакказ грибов. На примере реакций обесцвечивания трифенилметановых красителей в качестве наиболее эффективного медиатора был отобран 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфоновая кислота) (АБТС), повышающий редокс-потенциал до 0,7 В.

Текст диссертации написан хорошим научным языком. Таблицы и рисунки адекватно иллюстрируют полученные автором результаты. К недостаткам можно отнести опечатки и некоторые погрешности в оформлении, например, концентрация полиакриламидного геля на стр. 71 указана равной 5-12%, а на стр. 88 – 4-10%, отсутствует нумерация на странице 109, есть опечатка на странице 110: неправильно указан номер аминокислоты гистидина (110 вместо 101).

В ходе ознакомления с работой возникли некоторые вопросы:

1. Не понятно, почему для получения кристаллов лакказы с ингибиторами был выбран именно азид натрия, тогда как два других ингибитора (фторид натрия и фенантролин) не менее эффективны. Как автор

может объяснить повышение активности ферментов в присутствии 100 мМ этих ингибиторов при щелочных значениях рН.

2. Хорошо известно, что грибные лакказы, кроме природных субстратов, могут окислять широкий спектр ксенобиотиков (хлорзамещенные ароматические соединения, синтетические красители, полициклические ароматические углеводороды и т.д.), катализируя ключевые этапы деградации этих соединений. Среди представителей рода *Streptomyces* также известны деструкторы ксенобиотиков. По мнению автора, могут ли двухдоменные лакказы этих грибов участвовать в деградации ксенобиотиков?

3. Не понятно, на каком основании среди огромного множества синтетических красителей были выбраны именно трифенилметановые, которые, к тому же, без медиатора ферментами не окисляются. Не логичнее ли было использовать красители разных типов (антрахиноновые, азо-, трифенилметановые), которые окисляются ферментом не только в присутствии медиатора, но и напрямую?

4. В работе не описаны методы статистической обработки данных.

Однако эти недочеты не умаляют значимость полученных результатов и высокий научный уровень работы.

Результаты диссертации прошли необходимую апробацию. Они были доложены на отечественных и зарубежных научных конференциях, по результатам диссертации опубликованы: три статьи в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, один патент РФ, одна статья в сборнике материалов конференции.

Основные положения диссертационной работы полностью изложены в автореферате.

Резюмируя вышеизложенное, следует заключить, что диссертационная работа Л. И. Трубициной является оригинальным экспериментальным исследованием, выполнена на высоком методическом

уровне, и является законченной научной работой, которая вносит существенный вклад в развитие биохимии микроорганизмов.

Таким образом, по объему выполненных исследований, научному и методическому уровню, новизне и практической значимости полученных результатов, диссертационная работа соответствует специальности 03.01.04 – «биохимия», удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, а её автор – Трубицина Любовь Игоревна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук. Работа обсуждена на расширенном заседании лаборатории экологической биотехнологии (протокол № 3 от 29 мая 2017 года).

Заведующая лабораторией экологической биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук доктор биологических наук, профессор

 О.В. Турковская

Подпись Ольги Викторовны Турковской заверяю.
Ученый секретарь ИБФРМ РАН
кандидат биологических наук



 Т.Е. Пылаев

410049 Саратов, Проспект Энтузиастов, д. 13, ИБФРМ РАН
Тел.: +7 (8452) 970444, E-mail: turkovskaya_o@ibppm.ru

29 мая 2017 г.