

## Отзыв

на автореферат диссертации Степашкиной Анастасии Владимировны  
«Бактериальная пенициллинацилаза: взаимосвязь структура-функция и получение  
одноцепочечной формы фермента», представленной на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Объектом исследований Степашкиной А.В. в ходе выполнения диссертационной работы являлась пенициллинацилаза (ПА) из грамотрицательных бактерий *Alcaligenes faecalis*, ее мутантные формы, а также одноцепочечная (пермутированная) форма этого фермента. Данный объект исследований представляет интерес как биотехнологический объект, поскольку пенациллинацилазы широко применяются в качестве биокатализаторов в производстве антибиотиков, в том числе в промышленных масштабах. Создание новой генетической конструкции может позволить оптимизировать процесс производства, если будет найден способ получения активного биокатализатора с высоким выходом и хорошей степени чистоты. С другой стороны, ПА из *A.faecalis* является перспективным объектом фундаментальных исследований, поскольку данный фермент менее изучен, в отличие от других ПА, например, ПА из *E.coli*. Проведенное в данной работе исследование новых структурно-функциональных аспектов для ПА *A.faecalis* с помощью направленной модификации и рефолдинга белка представляет фундаментальный интерес для понимания механизмов фолдинга ПА.

Судя по результатам, представленным в автореферате, Степашкина А.В. выполнила большой объем экспериментальной работы с применением широкого набора методов. Диссертационная работа Степашкиной А.В. разделена на две части. В первой части автор описывает выполненные эксперименты по клонированию гена, экспрессии и очистке рекомбинантного белка ПА из *A.faecalis* дикого типа, а также его мутантных форм. Как для фермента дикого типа, так и для его мутантных форм были изучены каталитические свойства и термостабильность. Во второй части работы получена одноцепочечная (пермутированная) форма ПА из *A.faecalis* двух вариантов. Процедура наработки одноцепочечных форм ПА в ходе работы была оптимизирована, ферменты были очищены и охарактеризованы. Процесс очистки включал в себя разработанную автором эффективную методику рефолдинга белка из телец включения. Были получены кинетические параметры реакции, катализируемой одноцепочечными формами ПА, и параметры, характеризующие термостабильность белка. Ценным результатом данной работы является то, что полученные ферменты не отличались от фермента дикого типа по каталитическим параметрам, хотя и обладали более низкой термостабильностью.

Из автореферата диссертации Степашкиной А.В. следует, что автор владеет целым комплексом современных биохимических и физико-химических методов, а также обладает глубоким знанием литературных данных в исследуемой области. Однако можно высказать ряд замечаний, не влияющих на общую положительную оценку работы. В автореферате на стр. 7 приводится ссылка на диссертационную работу Ясной А.С., в которой описано клонирование гена ПА из *A. faecalis*. Из приведенного далее текста в том же абзаце не совсем ясно, описана ли в нем процедура клонирования из работы Ясной А.С., была ли данная процедура повторена или модифицирована Степашкиной А.В. На рис. 3 в подписи к рисунку указан Ser1 как каталитический остаток  $\beta$ Ser1 на N-конце  $\beta$ -субъединицы, однако на самом рисунке объект Ser1 отсутствует.

Содержание автореферата диссертационной работы Степашкиной А.В. полностью отражает экспериментальные результаты, опубликованные в ведущих журналах. Выводы диссертации адекватны полученным автором результатам. По новизне полученных данных и их значимости диссертационная работа Степашкиной А.В. соответствует требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК РФ, а автор работы заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов ФГБУН ИХБФМ СО РАН, член-корр. РАН, д.х.н., профессор  
11.12. 2017

  
О.И. Лаврик

Учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ФГБУН ИХБФМ СО РАН)

Официальный адрес: 630090 Россия, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, д. 8, ИХБФМ СО РАН

Тел. (383) 363-51-95, E-mail: lavrik@iboch.nsc.ru

Подпись О.И. Лаврик заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.х.н.

  
П. Е. Пестряков

