



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

10.09.2019 № 1 12-217744

на № _____ от _____

Директор ФБГУН
Института биоорганической химии РАН
им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук
академик А.Г. Габибов

2019 г.



**ОТЗЫВ
ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертационную работу Глазуновой Ольги Александровны «Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов», представляемую к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия

Лакказы – это медьсодержащие оксидазы, катализирующие окисление целого ряда фенольных и нефенольных ароматических соединений с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. В качестве катализаторов с широкой субстратной специфичностью лакказы могут применяться в различных областях промышленности – целлюлозно-бумажной, текстильной, пищевой, косметической, а также для органического синтеза, очистки сточных вод, биоремедиации почв и создания биосенсоров. Учитывая, что для каждого конкретного промышленного процесса требуются биокатализаторы с определенными свойствами, поиск и характеристика новых лакказ с различной субстратной специфичностью является актуальной задачей. Кроме того, систематическое изучение структуры и свойств лакказ из разных источников является важным шагом для глубокого понимания структурных основ функционирования этих ферментов.

Одной из основных характеристик лакказ, определяющей практическую возможность их применения, является окислительно-восстановительный потенциал. Однако, несмотря на долгую историю изучения лакказ и большое количество посвященных им работ, структурные особенности влияющие на величину окислительно-восстановительного потенциала данных ферментов до сих пор мало изучены. В этой связи, значительный практический интерес представляет изучение механизма встраивания ионов меди в активный центр лакказ, поскольку дефицит ионов меди в активном центре фермента приводит к потере его активности. Фундаментальный интерес представляет изучение механизма восстановления молекулярного кислорода в активном центре лакказ. В настоящее время, в предложенных исследователями механизмах не установлены детали связывания молекулярного кислорода в Т2/Т3 центре и высвобождения образующейся в процессе реакции молекулы воды.

Целью диссертационной работы Глазуновой Ольги Александровны было структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов. В работе четко сформулированы задачи необходимые для достижения поставленной цели и представлен полученный автором большой объем экспериментальных результатов.

В рамках исследования были выделены две новые лакказы базидиомицетов со средним окислительно-восстановительным потенциалом, изучены их физико-химические свойства и установлены пространственные структуры. Проведен их сравнительный анализ с лакказами обладающими высоким окислительно-восстановительным потенциалом. Проанализировано окружение ионов меди в центре Т1 и исследовано влияние его структуры на окислительно-восстановительный потенциал. Изучен механизм встраивания ионов меди с различной степенью окисления в центр Т2. При помощи метода serialной монокристальной кристаллографии уточнен механизм катализа лакказ.

Структура и содержание работы.

Диссертация Глазуновой Ольги Александровны изложена на 138 страницах. Материал иллюстрирован 17 таблицами и 38 рисунками. В работе представлены следующие разделы: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы.

В разделе «**Введение**» сформулированы актуальность темы, степень ее разработанности, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Очень подробный и хорошо написанный «**Литературный обзор**» позволяет составить детальное представление о текущем состоянии проблемы, дает достаточно полную информацию о данной группе ферментов, их физико-химических и катализитических свойствах,

аминокислотной последовательности и пространственной структуре. Обзор хорошо структурирован и дает все необходимые сведения для дальнейшего обсуждения результатов.

В разделе «**Материалы и методы**» даны необходимые сведения, касающиеся экспериментальной части работы, представлено подробное описание объектов исследования и используемых методов. Этот раздел свидетельствует о большом объеме проделанной экспериментальной работы и высокой квалификации автора.

Следующий основной раздел диссертации «**Результаты и их обсуждение**» состоит из девяти частей. **Первая часть** посвящена штаммам использованным в работе базидиомицетов и оценке их лигнолитического потенциала. **Вторая и третья части** посвящены описанию культивирования четырех выбранных штаммов базидиомицетов и очистке препаратов лакказ. **В четвертой части** приводятся данные по определению окислительно-восстановительных потенциалов новых лакказ из *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. **Пятая, шестая и седьмая части** раздела посвящены изучению физико-химических и каталитических свойств исследуемых объектов, а также их сравнению с лакказами с высоким и низким окислительно-восстановительными потенциалами. Показано, что новые лакказы из базидиомицетов *A. faginea* и *S. murashkinskyi* характеризуются средними окислительно-восстановительными потенциалами (620 и 650 мВ отн. НВЭ), высокой термостабильностью и способны катализировать окисление ряда фенольных соединений с эффективностью сопоставимой (и даже превышающей) с лакказами из базидиомицетов *C. caperata* и *T. hirsuta* с высокими окислительно-восстановительными потенциалами. Сравнение скоростей ферментативного окисления фенольных соединений этими четырьмя лакказами показало, что для окисления монофенольных соединений с потенциалом выше 700 мВ, а также фенольных красителей, определяющим фактором является окислительно-восстановительный потенциал иона меди в центре T1 лакказ. Для монофенольных соединений с потенциалом окисления ниже 700 мВ корреляции между окислительно-восстановительным потенциалом иона меди в центре T1 лакказ и эффективностью окисления этих субстратов не наблюдалось. **Восьмая часть** раздела посвящена изучению пространственных структур исследуемых лакказ рентгеноструктурными методами. С высоким разрешением, 1.60 – 1.89 Å, установлены структуры лакказ *A. faginea* и *C. caperata* с удаленным из центра T2 ионом меди (T2D) и комплексов T2D лакказы *C. caperata* с солями меди CuCl и CuSO₄, а также, со сверхвысоким разрешением 0.95 Å - структура *S. murashkinskyi*. Для лакказы *C. caperata* было показано, что в центр T2 с удаленным ионом меди могут встраиваться только ионы меди со степенью окисления +1. Для этой лакказы показана возможность восстановления ее активности при обработке солью CuCl в растворе. Также, для исследуемых объектов было изучено влияние структуры окружения иона меди в T1 центре на окислительно-восстановительный потенциал. Показано, что его

величина коррелирует с доступностью к растворителю консервативных участков окружения иона меди и позволяет дать ее приблизительную оценку на основе известной пространственной структуры. *В девятой части* раздела описывается исследование динамики восстановления молекулярного кислорода в активном центре лакказы под действием ионизирующего рентгеновского излучения. При помощи метода сериальной кристаллографии высокого разрешения для лакказы *S. murashkinskyi* с одного кристалла была получена серия пространственных структур с возрастающими дозами поглощенного рентгеновского излучения. Здесь, впервые была установлена взаимосвязь между координацией ионов меди в T2/T3 центре и их степенью окисления. На основании анализа полученной серии кристаллических структур уточнен механизм восстановления кислорода до воды в активном центре лакказ.

В разделе «**Заключение**» представлены выводы диссертационной работы. Выводы основаны на полученном в работе материале и соответствуют поставленным задачам. Сделанные выводы свидетельствуют о том, что рассматриваемую диссертационную работу можно считать самостоятельным и законченным научным исследованием.

В ходе ознакомления с диссертационной работой Глазуновой Ольги Александровны серьезных недостатков выявлено не было. Можно сделать лишь небольшие замечания касательно некоторых стилистических погрешностей наличие которых, однако, не носит принципиального характера и не влияют на общую высокую оценку диссертационной работы. Очевидно, несмотря на завершенный характер диссертации, работа в этом направлении, по-видимому, будет продолжена. В этой связи, представляется целесообразным дальнейшее развитие структурно-функционального аспекта работы на базе уже полученного структурного материала. В частности, было бы целесообразно уже экспериментальными методами рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза детально изучить специфичность связывания субстрата ее взаимосвязь с каталитической активностью.

В целом, представленная к защите работа очень объемная, выполнена на высоком профессиональном уровне с использованием современных рентгеноструктурных, физико-химических и биохимических методов. Полученные результаты изложены подробно и корректно интерпретированы. Выводы логично вытекают из экспериментальных данных. Диссертация хорошо читается и прекрасно иллюстрирована. Автореферат и публикации соискателя полностью отражают содержание диссертации. Рецензируемая работа является законченным исследованием, обладающим несомненной новизной и существенной научной значимостью. Результаты исследований опубликованы в 7-и статьях в рецензируемых изданиях входящих в международные реферативные базы данных Scopus и Web of Science и 9-ти тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях. Содержание

автореферата и опубликованные статьи полностью соответствуют содержанию диссертационной работы. Полученные результаты могут быть использованы на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова и в Учреждениях Российской академии наук: Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте цитологии РАН, Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Диссертационная работа Глазуновой Ольги Александровны является самостоятельным законченным исследованием и по актуальности темы, научной новизне, теоретической и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Диссертация О.А. Глазуновой и отзыв были заслушаны и утверждены на семинаре Отдела геномики и постгеномных технологий Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

« 2 » сентября 2019 г.

Федеральное государственное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, город Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10
Тел. +7 (495) 335-01-00
Электронная почта: office@ibch.ru
Сайт: www.ibch.ru

Заведующий лабораторией рентгеноструктурных исследований биополимеров

Доктор химических наук

« 2 » сентября 2019 г.

В.З. Плетнев

личную подпись: Глазунова В.З

УДОСТОВЕРЯЮ

СПЕЦИАЛИСТ ОТДЕЛА
КАДРОВ ИБХ РАН
КОРНЕЕВА А.Б.

