

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической
безопасности Российской академии наук (НИЦЭБ РАН)**

ул. Корпусная, д.18, Санкт-Петербург, 197110
Телефон: (812) 499-64-54, факс: (812) 499-64-74
E-mail: srces@ecosafety-spb.ru, сайт www.ecosafety-spb.ru
ОКПО 13173050, ОГРН 1037828012672, ИНН/КПП 7813047368/781301001

«23» мая 2019г.
Исх.№ 16513/01-10

УТВЕРЖДАЮ»
Директор НИЦЭБ РАН
доктор геолого-минералогических наук
Трошин А.А.
2019 г



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы Макрушина Кирилла Валерьевича «L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Актуальность темы диссертации

Актуальность темы определяется недостаточной теоретической разработкой вопросов биосинтеза и выделения оксидаз L-аминокислот, а также возрастанием роли энзимотерапии опухолей, основанной на разной чувствительности нормальных и опухолевых клеток к дефициту факторов роста, в том числе, аминокислот.

Среди наиболее перспективных противоопухолевых ферментов следует указать ЛО, L-аспарагиназу и L-метионин- γ -лиазу. Налажен промышленный выпуск L-аспарагиназы во многих странах, в России такого производства нет.

Лекарственный препарат на основе ЛО не заменит L-аспарагиназу, но позволит расширить диапазон терапевтического использования противоопухолевых ферментов.

До настоящего времени в России создание лекарственной формы ЛО сдерживалось отсутствием активного штамма-продуцента, а также отсутствием эффективной технологии получения фермента. Разработанные ранее методы выделения и очистки фермента ЛО были неэффективными, трудоемкими или не отвечали экологическим нормам производства из-за использования больших объемов органических растворителей.

Выявление факторов, предопределяющих возможную функциональную роль ЛО для гриба-продуцента в природной окружающей среде являются актуальными в связи с вопросами об адаптивных преимуществах и конкуренции с другими организмами, а также индуцировании системной устойчивости растений и возможном участии во взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Патоген».

Вопросы влияния различных факторов на стратегию гриба с участием ЛО как одного из механизмов регуляции межвидовых взаимоотношений остаются актуальными для исследования, поскольку каждый из факторов заслуживает отдельного наблюдения и исследования. Это дает основание утверждать, что научная проблема, сформулированная в

диссертации, является актуальной.

Выбранная диссертантом тема представляет интерес не только для специалистов в данной области знаний, но и для исследователей в областях сельского хозяйства, биохимии, медицине, биотехнологии.

Новизна исследования

Все представленные в диссертации результаты сопоставлены с опубликованными данными других исследователей, на основании чего можно судить об их приоритетности и новизне.

На основании проведенных исследований был выделен новый высокоактивный природный штамм-продуцент ЛО. Отобранный штамм был идентифицирован и депонирован в ВКМ (ИБФМ РАН) как *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D.

Впервые обнаружено, что синтез ЛО происходит на средах, содержащих семена культурных и диких злаковых растений.

Подобраны условия биосинтеза ЛО, позволяющие получить высокий уровень накопления в ростовой среде фермента, достигающий 175 Е/г субстрата. В настоящее время данные о получении такого высокого уровня биосинтеза ЛО при любых типах ферментации *Trichoderma* в научной литературе отсутствуют.

Предложены два метода очистки фермента: один из них базируется на общепринятых (рутинных) подходах, основанных на осаждении сульфатом аммония; второй – оригинальный метод, основанный на осаждении ЛО из культуральной жидкости солями Cu^{2+} . Оба метода позволяют получить гомогенный препарат ЛО с высокой активностью (100 Е/мг белка) и практическим выходом 55 %.

Впервые исследованы кинетические характеристики фермента с учетом наличия 2-х субъединиц и аллостерических эффектов. Были оценены коэффициент Хилла ($h = 2,03 \pm 0,14$) и константа Михаэлиса-Ментен ($K_m = 1,015 \cdot 10^{-5}$ М), величина которой показывает высокое сродство ЛО к лизину.

Впервые выявлены факторы, предопределяющие возможную функциональную роль ЛО как возможное участие во взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Патоген». Показано, что биосинтез фермента сопровождается накоплением в среде роста пипеколиновой кислоты и пероксида водорода – элиситоров системной устойчивости растений.

Впервые изучены механизмы антимикробного действия ЛО как фактора конкуренции гриба *Trichoderma* с грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также фитопатогенными грибами.

Степень обоснованности полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация Макрушина К.В. носит завершённый характер, оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы.

Экспериментальный материал получен на основе сочетания классических и современных микробиологических, биотехнологических, биохимических, методов анализа, что определяет достоверность обобщенных и систематизированных результатов проведенного исследования. Обоснованность полученных результатов подтверждается количеством проведенных экспериментов, широкой репрезентативной выборкой. В работе прослеживается логика предположений и их доказательства с использованием современных научных методов.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам и согласуются с основными результатами проведенных исследований. Материалы диссертационной работы полностью отражены в автореферате и статьях, опубликованных в цитируемых профессиональных научных журналах “Микробиология”, “Прикладная биохимия и микробиология”, “Биотехнология”, широко обсуждались на международных научных конференциях.

Следует отметить, что диссертационная работа К.В. Макрушина вносит значительный вклад в изучение процессов биосинтеза не только лизин- α -оксидазы, но и других оксидаз аминокислот, а также в понимании функциональной роли фермента для гриба *Trichoderma*.

Анализ структуры и основного содержания работы

Диссертация Макрушина К.В. носит законченный характер, оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Структура диссертации Макрушина К.В. традиционна и включает в себя введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования и восьми разделов, представляющих полученные результаты и их обсуждения, заключение, выводы, список используемой литературы, включающий 225 литературных ссылок, 182 из которых зарубежных авторов. Работа представлена на 122 листах основного текста и содержит 35 рисунков и 18 таблиц.

Во введении автор обосновывает актуальность проблемы, кратко излагает современное состояние вопроса, представляет план собственного исследования, содержащий цели и задачи диссертационной работы, ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту, апробацию результатов и связь работы с научными программами.

Первая глава диссертации содержит обзор литературы, состоящий из 2-х разделов.

В первом разделе дается краткая характеристика грибов рода *Trichoderma*, их практическое применение в промышленности, сельском хозяйстве и медицине.

Во втором разделе освещены оксидазы L-аминокислот выделенные из различных источников. Автор дает характеристику этих ферментов, описывает их физико-химические свойства, биологическое действие, такое как антибактериальная, противовирусная и противоопухолевая активность, а также затрагивает вопросы функциональной роли оксидаз аминокислот для продуцентов.

Во второй главе диссертации представлено описание объектов и методов исследования. Указывается, что скрининг проводили, используя большую выборку штаммов кандидатов (22). Достаточно подробно описаны микробиологические, биохимические, биотехнологические и химико-аналитические методы, использованные в работе. Примененные методики и подходы позволяют заключить, что для решения поставленных задач автор использовал в своей работе современные высокоточные методы исследования. Указано, что все полученные результаты подвергались статистической обработке, что доказывает достоверность полученных результатов.

Третья глава посвящена результатам собственных исследований Макрушина К.В. и их обсуждению. В первом разделе третьей главы подробно описывается процесс отбора штамма- продуцента. Во втором разделе описаны морфологические признаки отобранного штамма- продуцента, а так же определение его таксономического положения.

В третьем разделе представлены данные об оптимизации процесса биосинтеза L-лизин α -оксидазы, полученные в опытах в колбах и биореакторах лабораторного типа. Особое внимание уделяется определению факторов, влияющих на интенсивность биосинтеза (уровень накопления L-лизин α -оксидазы). Подробно описан подбор состава среды культивирования, включая субстрат роста, различные добавки в ростовую среду.

Сравниваются результаты, полученные при различных типах культивирования, твердофазном и погруженном. Отдельное внимание уделено отработке процессов синтеза в биореакторах, а также влиянию физико-химических факторов.

В четвертом разделе представлены данные по очистке фермента. Подробно описаны два метода очистки L-лизин-а-оксидазы, проведено сравнение особенностей и преимуществ этих методов.

Следующий этап исследований (пятый раздел) посвящен изучению свойств фермента. Изучены кинетические характеристики фермента с учетом наличия 2-х субъединиц и аллостерических эффектов. Были оценены коэффициент Хилла и константа Михаэлиса-Ментен, величина которой показывает высокое сродство ЛО к лизину. Установлены молекулярная масса фермента, кофермент (ФАД), температурный и рН оптимумы. Показана узкая субстратная специфичность, а также стереоспецифичность ЛО. Показаны высокая стабильность, в том числе, при хранении в лиофилизованном состоянии, к действию температуры, протеаз и детергентов.

Наиболее важной частью этого раздела представляются данные, характеризующие кинетические особенности и стабильность фермента. Именно эти параметры говорят об адаптационном потенциале фермента и гриба-продуцента в природном окружении.

Высокая активность, высокое сродство к субстрату и узкая субстратная специфичность являются существенными характеристиками не только для потенциального медицинского препарата, но также для биоконтроля и симбиотических взаимодействий гриба-продуцента, что может предопределять физиологическую роль внеклеточного фермента ЛО.

Шестой и седьмой раздел представленной работы содержат информацию, касающуюся определения стерильности и хранения очищенной субстанции L-лизин-а-оксидазы, что имеет большое значение для оценки перспективы использования лекарственных средств.

Наиболее важные данные, полученные Макрушиным К.В., содержатся в восьмом разделе, где обсуждаются антимикробное действие, а также затрагиваются вопросы о функциональной роли этого фермента для продуцента.

Исследовано накопление в ростовой среде веществ, предопределяющих функцию ЛО для продуцента: пипеколиновой кислоты и пероксида водорода, которые, как известно из текущей литературы, являются элиситорами системной устойчивости растений. Эти данные говорят в пользу участия ЛО во взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Патоген».

Изучены механизмы антимикробного действия ЛО как фактора конкуренции гриба *Trichoderma* с грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также фитопатогенными грибами. Показано, что возможный механизм основан на образовании экзогенного пероксида водорода в результате каталитической активности ЛО, а также генерации внутриклеточных активных форм кислорода.

Исследование антагонистического действия ЛО было проведено согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ. Для большей достоверности результатов и расширения представлений об антимикробном действии ЛО были дополнительно использованы микроорганизмы, не входящие в список тестовых микроорганизмов, рекомендованных фармстатьей для установления стерильности и антимикробных свойств препаратов.

Значимость для науки и практики представленных в диссертации результатов

- На основе данных диссертационной работы разработан лабораторный регламент получения ЛО. Полученные данные также могут быть использованы при разработке других биотехнологических процессов микробиологического синтеза различных

соединений.

Установленные свойства гомогенного препарата ЛО, такие, как высокая активность и стабильность, а также узкая субстратная специфичность и высокое сродство к лизину, обеспечивают его использование в медицинских исследованиях как перспективное лекарственное средство в терапии онкологических заболеваний. Полученный гомогенный препарат ЛО проходит доклиническое исследование в ГОУ «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина, подтверждена его противоопухолевая активность.

Кроме того, указанные свойства фермента предполагают его использование в биоинженерии белков, а также для создания биохимических тестов для определения лизина.

Активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий позволит использовать ЛО в качестве перспективного потенциального инструмента в разработке новых лекарственных средств против бактерий, резистентных к антибиотикам.

Полученные результаты внесут существенный вклад в современные представления о механизмах адаптации микроорганизмов и возможной роли этих механизмов в эволюционных процессах.

Результаты исследования дополняют представления о взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Патоген», развитии системной устойчивости растений, а также об использовании грибов рода *Trichoderma* в качестве биоконтрольного агента и их адаптационном потенциале.

- Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых эффективных препаратов на основе грибов *Trichoderma* (активных продуцентов L-лизин α -оксидазы) для защиты растений от патогенов и вредителей, обеспечивающих высокую урожайность и хранение полученных сельскохозяйственных продуктов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Экспериментальные данные и методические приемы, представленные в диссертации, могут быть использованы в организациях биологического, биотехнологического и сельскохозяйственных профилей. Особый интерес результаты исследований Макрушина К.В. представляют для медицинских учреждений, занимающихся исследованием и разработкой противоопухолевых препаратов. Полученные результаты могут быть использованы при подготовке образовательных курсов по микробиологии, биотехнологии, экологии микроорганизмов.

Однако при чтении работы возникли следующие вопросы и замечания

- В разделе “Материалы и методы” желательно было бы привести условия проведения анализа аминокислот и пипеколиновой кислоты, в то время как представление полного состава общепринятых питательных сред представляется избыточным
- В Списке литературы из 235 только 8 источников опубликовано после 2015г.
- Идентификацию культуры *Trichoderma cf. aureoviride* по макро- и микроморфологии желательно было бы подтвердить современными методами исследования
- В большинстве таблиц и рисунков не представлены стандартные отклонения величин, что затрудняет оценку достоверности результатов исследования

Перечисленные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку диссертации.

Заключение

Диссертация Макрушина Кирилла Валерьевича «L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D», представленная на соискание степени

кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой. По своей научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует критериям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», установленного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Макрушин Кирилл Валерьевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03-микробиология.

Диссертационная работа Макрушина Кирилла Валерьевича «L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D» и отзыв обсуждены на расширенном заседании лаборатории биологических методов экологической безопасности НИЦЭБ РАН 23 января 2019 г. (Протокол №1).

Зав. лаборатории биологических методов
экологической безопасности НИЦЭБ РАН,
д.т.н.



Медведева Н.Г.

