

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук Шеломова Михаила Дмитриевича

на тему: «Оксидазы D-аминокислот из дрожжей: получение и структурно-функциональные исследования»

по специальностям 1.5.4 – Биохимия и 1.5.6. – Биотехнология.

Диссертация Шеломова Михаила Дмитриевича посвящена получению и изучению рекомбинантных дрожжевых оксидаз D-аминокислот с заданными свойствами.

Были получены и изучены шесть новых оксидаз D-аминокислот из промышленно важного штамма метилотрофных термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1. Гены этих ферментов были обнаружены автором работы за пределами официальной аннотации. Все полученные ферменты обладают уникальными спектрами субстратной специфичности и беспрецедентными свойствами каталитической активностями для промышленно значимых субстратов. Характеризация набора новых рекомбинантных оксидаз D-аминокислот позволила автору использовать установленные взаимосвязи структура-функция данных ферментов для компьютерного моделирования и предложить улучшенный подход к поиску новых ферментов данного типа *in silico*. Новый подход был успешно апробирован и гены оксидаз D-аминокислот были найдены в бактериях и археях при анализе базы данных экстремофильных микроорганизмов МГУ им. М.В. Ломоносова. На основе сравнения структур активных центров была предсказана субстратная специфичность новых ферментов.

Также в рамках диссертация представлена работа по получение многоточечных мутантных форм оксидазы D-аминокислот из другого микроорганизма *Trigonopsis variabilis*, которая используется в промышленности для получения цефалоспориновых антибиотиков.

Полученные мутантные формы обладают лучшими в мире параметрами для данного биокаталитического процесса.

Диссертационная работа Шеломова М.Д. построена по классической схеме. Она состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов», «Результатов и обсуждения», «Заключения», «Выводов» и «Списка цитируемой литературы».

Диссертационная работа Шеломова М.Д. изложена на 132 страницах, содержит 34 рисунков, 32 таблиц и включает в себя ссылки на 131 литературный источник. **Введение** отражает цель и задачи диссертационной работы, новизну и практическую значимость, оценку степени достоверности и описание апробации работы, содержит положения, выносимые на защиту, обобщение о публикациях, проведенных по результатам работы. **Обзор литературы** состоит из 3 глав, содержание которых отражает состояние исследований в области диссертационной работы. В первой главе приводятся общие сведения об оксидазе D-аминокислот. В главе 2 приводятся свойства изученных оксидаз D-аминокислот на момент написания диссертации. Глава 3 посвящена дрожжам *Ogataea parapolymorpha*, организму из которого были выделены основные изучаемые ферменты. **Экспериментальная часть** работы изложена в главах «Материалы и методы» и «Результатов и их обсуждения». Завершается работа «Выводами», «Заключением» и «Списком литературы». **Выводы** сформулированы четко, основаны на экспериментальных данных. **Список литературы** включает результаты самых последних исследований (доля статей за 2012-2023 гг. составляет более 35%).

Достоверность и **научная новизна** диссертационного исследования и полученных выводов подтверждается 8 публикациями в рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus. Так 6 статьей с соавторством Шеломова Михаила Дмитриевича опубликовано в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus

и 2 тезисов докладов в международных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 14 тезисов докладов.

Одним из важнейших достижений автора является установление того факта, что в геноме одного организма может быть до шести генов оксидаз D-аминокислот. Однако в обсуждении результатов такой необычный факт и его значимость для организации генома термотолерантных дрожжей не обсуждается. Вторым важным моментом является то, что авторам удалось клонировать и получить в растворимой форме пять из шести найденных ферментов. Результаты работы показали, что те гены, которые были аннотированы в геноме, были аннотированы неверно. Очень важным моментом является то, что изученные ферменты продемонстрировали очень большое разнообразие физико-химических свойств, особенно, в частности, субстратной специфичности и рН-профилей активности и стабильности. Также авторами были построены модельные структуры ферментов и проведен анализ структурных данных, установлены взаимосвязи структура-функция.

Во второй главе автор очень элегантно показал, как результаты первой части, полученные на одном организме, могут быть использованы для поиска новых ферментов того же типа и предсказания их субстратной специфичности. Были выявлены критерии, по которым оксидазы D-аминокислот можно отличить от гомологичных им глицинооксидаз.

Третья часть работы посвящена белковой инженерии оксидазы D-аминокислот из другого организма, которая используется в промышленном процессе получения цефалоспориновых антибиотиков. Работа состояла в объединении ранее найденных мутаций, приводящих к улучшению свойств фермента. Безусловной удачей автора является тот факт, что выбранные замены имели аддитивный эффект, и полученные мутантные формы рекомбинантного белка одновременно обладают улучшенными каталитическими свойствами в реакции окисления цефалоспорина C, и температурной и химической стабильностями. Причем ферменты,

содержащие все выбранные замены являются на момент защиты диссертации лучшими в мире по этим критериям.

Однако к данной работе можно сделать несколько незначительных замечаний, которые не являются сутевыми и относятся к представлению данных. Получен большой массив экспериментальных данных, возможно это причина недостаточно подробного изложения методов, использованных в работе. Некоторые рисунки не читаются, например 4.11, 4.12. Возможно стоило их вынести в приложение к работе.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа Шеломова Михаила Дмитриевича является завершенной научно-квалификационной работой, в рамках которой были получены новые уникальные ферменты, перспективные для использования в промышленности. Были получены пять активных ферментов с уникальной субстратной специфичностью, лучшими каталитическими параметрами по D-Phe, D-Pro, D-Ser, D-Ala. Также были получены многоточечные мутантные ферменты с лучшими каталитическими параметрами по цефалоспоринолу C, а также температурной и химической стабильностью. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальностям 1.5.4 – биохимия и 1.5.6. – биотехнология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Автор работы безусловно заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4 – биохимия и 1.5.6. - биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук

Профессор кафедры химии природных соединений,
заместитель декана по научной работе (по совместительству)
химический факультет Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова

Зверева Мария Эмильевна

Подпись

05 мая 2023 г.

Контактные данные:

Телефон: +7 (499) 939-43-33,

E.mail: mzvereva@chem.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация:

02.00.10 – «биоорганическая химия», 03.01.03 – «молекулярная
биология»

Адрес места работы:

119991, Россия, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Подпись Зверевой М.Э. заверяю.