

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации 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.

Оксидазы D-аминокислот являются практически значимыми ферментами, используемыми как в аналитической биотехнологии, как и в крупнотоннажном производстве. Поиск и получение новых ферментов этой группы со свойствами, подходящими под разные биотехнологические процессы, является важной научно-практической задачей.

В рамках работы М.Д. Шеломова были получены новые биокатализаторы, перспективные для практического применения. Также был разработан новый подход к поиску оксидаз D-аминокислот с заданными свойствами по геномным данным, что потенциально значительно облегчает дальнейшую работу по оптимизации биотехнологических процессов, связанных с использованием данных ферментов.

Диссертационная работа М.Д. Шеломова изложена по традиционному плану на 132 страницах, содержит 34 рисунка и 32 таблицы, и состоит из: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, основной части, содержащей результаты исследования и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 131 ссылку.

Обзор литературы посвящен общим данным об изучаемой группе ферментов, приведены их свойства и биологическая роль, описана структура и механизм действия. Также в обзор включен раздел с общими данными по организму, из которого в ходе работы были выделены новые ферменты.

В разделе «Материалы и методы» описаны реагенты и методы, использованные в экспериментах данной работы. В ходе выполнения исследования автором было применено большое количество самых современных методов и подходов из различных областей – биоинформатики, биохимии, энзимологии, молекулярной биологии и генетической инженерии, а также аналитической химии. Отдельно стоит отметить использование новейшего метода компьютерного моделирования структур белков – AlphaFold2.

Экспериментальная часть работы логически делится на три этапа. На первом этапе соискатель произвел поиск генов новых оксидаз D-аминокислот в промышленно значимом штамме *Ogataea parapolymorpha* DL-1. Гены этих ферментов были успешно найдены, причем официальная автоматическая аннотация генома этого микроорганизма оказалась неверной. Несомненной удачей оказалось обнаружение целых шести генов, что является абсолютным рекордом для данного типа ферментов. Пять из шести ферментов были получены в рекомбинантной форме, очищены и детально охарактеризованы. Среди изученных ферментов были обнаружены белки с наивысшими, среди всех известных оксидаз D-аминокислот, каталитическими параметрами по отношению к некоторым практически значимыми субстратами. Данные результаты позволяют предположить, что полученные ферменты найдут практическое применение. Также в этой части диссертационного исследования проведена большая работа по построению и описанию модельных структур ферментов с использованием новейших технологий компьютерного моделирования, а также выявлению взаимосвязей их структуры и функций.

Результаты компьютерного моделирования позволили диссертанту на следующем этапе работы провести поиск новых оксидаз D-аминокислот по геномным данным экстремофильных микроорганизмов. Автором предложен интересный подход для оценки субстратной специфичности ферментов, основываясь на аминокислотной последовательностях. Этот подход позволяет не только различить потенциальные глицинооксидазы и оксидазы D-аминокислот, но и предсказать специфичность последних к разным D-аминокислотами. Данный подход был успешно апробирован. Автор обнаружил несколько новых потенциальных оксидаз D-аминокислот у бактерий и архей. Один из бактериальных ферментов был выделен, и его субстратная специфичность совпала с предсказанной, что является несомненным подтверждением работоспособности предложенного подхода. Следует отметить также, что гены, кодирующие оксидазы D-аминокислот у архей были обнаружены впервые.

В заключительной небольшой части работы автор помимо навыков по поиску и изучению новых ферментов продемонстрировал владение методами белковой инженерии. Путем объединения ранее изученных мутаций были получены многоточечные мутантные формы оксидазы D-аминокислот из

дрожжей *Trigonopsis variabilis* для создания более эффективного промышленного биокатализатора для процесса окисления цефалоспориона С. Данный процесс является основным случаем практического применения оксидазы D-аминокислот. Цель была успешно достигнута, объединение мутаций показало наличие аддитивного эффекта и были получены биокатализаторы, в несколько раз превосходящие по всем значимым параметрам все известные на данный момент ферменты.

Работа М.Д. Шеломова выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением современных методов исследования, что обуславливает надежность полученных экспериментальных данных. Выводы подкреплены подробным описанием проведенных экспериментов. В этом плане достоинства работы несомненны.

Диссертационная работа лишена существенных недостатков, которые могли бы препятствовать ее успешной защите. Тем не менее, в отношении работы можно сделать несколько замечаний.

1. В тексте диссертации недостаточно подробно представлен ход очистки ферментов и характеристика полученных белковых препаратов. Целесообразно было бы представить в работе результаты электрофоретического анализа полученных препаратов ферментов, а также пояснить, каким образом были получены приведенные значения выхода после очистки и степени очистки. Наличие таких данных, в частности, позволило бы избежать присутствующего в тексте противоречия между накоплением белка ОраDASPO в среде, выходом и степенью очистки.
2. Ряд подписей к рисункам в диссертационной работе следовало бы доработать. Так, из подписи к рис. 4.5 неочевидны условия, при которых получены данные, в частности, состав буферов, их концентрация и рН, что затрудняет восприятие. Из подписи к рисункам 4.7.1-4.7.4 неясно, к какому ферменту относятся приведенные данные. В подписях к рисункам 4.7.1-4.7.4 и 4.8.1-4.8.6 встречается некорректное обозначение «рН = ...».
3. Представление разброса экспериментальных данных также следовало бы доработать. В тех случаях, когда ошибки эксперимента представлены, не указано какие конкретно параметры приведены. На рисунках 4.4, 4.6, 4.7.1-4.7.7 и 4.8.1-4.8.6 значения экспериментальных ошибок отсутствуют.
4. В таблицах 4.6.1-4.6.3 не указаны единицы измерения приведенных значений.

5. В разделе «Материалы и методы» при описании условий центрифугирования следовало бы указать, помимо скорости вращения ротора (об/мин), еще и радиус ротора. Более корректным было бы заменить данные параметры, как обычно принято, фактором разделения – отношением центробежного ускорения к ускорению свободного падения (g).
6. Во многих местах использованы некорректные обозначения единиц измерений времени «минута» вместо «мин» и «час» вместо «ч».
7. Отдельно необходимо отметить, что в обзоре литературы, на мой взгляд, не хватает более подробного описания подходов к поиску новых оксидаз D-аминокислот и связанных с этим проблем. Также было бы целесообразно включить в обзор разделы, посвященные созданию биосенсоров на основе оксидаз D-аминокислот и практическому потенциалу использования ферментов, полученных в рамках работы.

Следует подчеркнуть, что высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности диссертационной работы, которая, безусловно, заслуживает высокой оценки.

По материалам диссертационной работы опубликовано 6 статей в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, тезисы 2 докладов опубликованы в изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus, кроме того, опубликованы тезисы 14 докладов на всероссийских и международных конференциях. Публикации полностью отражают содержание работы.

Подводя итоги, можно констатировать, что диссертационная работа Михаила Дмитриевича Шеломова является завершенным квалификационным исследованием, выводы работы полностью подтверждены результатами различных экспериментов, автореферат и публикации полностью отражают основное содержание диссертации. Диссертация М.Д. Шеломова соответствует специальностям 1.5.4 – «биохимия» и 1.5.6. – «биотехнология» (по химическим наукам). Работа полностью отвечает критериям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова в пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени

М.В. Ломоносова. Автор работы М.Д. Шеломов 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
заведующий лабораторией функциональной энзимологии
Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт».
Профессор РАН, доцент,
Демидюк Илья Валерьевич

04 мая 2023 г.

Контактные данные:

Телефон: +7-499-196-18-53, E.mail: duk@img.ras.ru 

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

Адрес места работы:

123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 2.

Подпись Демидюка И.В. заверяю.

Главный ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»

К.Е. Борисов