

## ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук, профессора Ефременко Елены Николаевны на диссертационную работу Самойловой Юлии Валерьевны «Изучение свойств бактериальных термостабильных липолитических ферментов и биокатализаторов в реакциях гидролиза и переэтерификации», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе биотехнологии)»**

Диссертационная работа Самойловой Ю.В. направлена на разработку новых ферментных биокатализаторов на основе эстераз, выделенных из термофильных бактериальных клеток, которые могут быть успешно использованы в гидролитических процессах, а также в процессах переэтерификации разных субстратов, проявляя при этом высокую стабильность каталитического действия.

Анализ структуры диссертационной работы Самойловой Ю.В. свидетельствует о том, что она написана в соответствии с традиционным планом и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 254 литературных источника, из которых 153 – опубликованы за последние 10 лет (60% от общего числа) и 26 (10% от общего числа ссылок) – в последние 3 года (2016-2018 гг.). Последние цифры свидетельствуют о том, что автор диссертации, действительно, хорошо осведомлен не только о современном, но и о текущем состоянии научных результатов, достигнутых в области, выбранной для выполнения диссертационной работы. Материалы диссертации изложены на 130 страницах, содержащих 37 рисунков и 24 таблицы.

Сведения, представленные в Обзоре литературы (стр.11-33 диссертации), грамотно и критически обобщают известные на сегодняшний день опубликованные разными исследователями результаты по исследованию структуры и свойств бактериальных эстераз, которые катализируют гидролиз сложноэфирных связей в разных субстратах, отличающихся между собой длиной остатков жирных кислот. Особое внимание автора работы ориентировано на свойства липаз, обладающих выраженной термостабильностью, а также на возможность получения рекомбинантных форм бактериальных ферментов с высокой долей растворимого белка.

Не вызывает никаких сомнений **актуальность** выбранной автором темы и самих исследований, выполненных в рамках этой диссертационной работы, поскольку те биокатализаторы, которые целенаправленно разрабатывались автором, начиная с отбора кандидатных клеток для выделения необходимых ферментов, получения самих рекомбинантных ферментов, их стабилизации различными методами с целью получения длительно и эффективно функционирующих биокатализаторов, и заканчивая самой демонстрацией свойств полученных ферментных биокатализаторов в крайне важных сегодня процессах – разложении пестицидов (на примере фосфорорганического пестицида – малатиона) и переэтерификации жиров, получении основных компонентов биодизеля – предназначены для решения большого круга современных научно-практических задач. Кроме того, в основе исследования – ферментативный катализ, являющийся экологичным решением многих текущих мировых проблем, альтернативным традиционным химическим процессам.

В главе «Материалы и методы» довольно подробно описаны разнообразные примененные автором методы исследований, которые обеспечили возможность их использования для получения воспроизводимых результатов в данной диссертации.

В главе «Результаты и обсуждение» автор подробно и убедительно раскрывает в диссертационной работе содержание полученных результатов, наиболее значимыми из которых, с моей точки зрения, являются разработка нескольких эффективных и высоко стабильных биокатализаторов на основе новых рекомбинантных липолитических ферментов с демонстрацией их высокого практического потенциала в различных процессах: получении биодизельного топлива, масложировых продуктов и очистки сточных вод. При этом исходно гены, кодирующие синтез новых термостабильных ферментов были получены автором диссертации из клеток бактерий, которые были выделены из полевых образцов компоста и идентифицированы. Проведенный филогенетический и биохимический анализ выделенной диссертантом эстеразы позволили автору с полным пониманием того, с каким ферментом проводится работа, приступить к получению его рекомбинантной формы, которая была выделена и использована для иммобилизации с целью придания еще более высокой стабильности ферменту для последующего запланированного длительного использования его в биокаталитических процессах.

Таким образом, автором диссертации в своей работе были активно задействованы самые разные современные методы исследования:

микробиологические, биоинформационные, гено-инженерные, биотехнологические, методы аналитической химии, биохимии и энзимологии. Всё это свидетельствует о высокой квалификации автора данной диссертационной работы и широкой разноплановости успешно выполненной работы.

Все результаты, полученные и представленные автором в диссертации, являются оригинальными, так как использованы новые микробные источники для выделения генов новых ферментов, новые рекомбинантные формы ферментов, новые биокатализаторы на их основе и соответствующие их применению процессы. **Научная новизна** полученных автором результатов подтверждается пятью статейными публикациями в журналах Web of Science, в том числе в двух рецензируемых журналах с «немалым» импакт-фактором (2,0 и 3,465).

**Научно-практическая значимость работы** не вызывает сомнений, поскольку представленные в диссертации данные важны для дальнейшего развития биокаталитического использования созданных новых высокостабильных ферментных биокатализаторов, длительно функционирующих практически в денатурирующих условиях – при высоких температурах и в средах с высокими концентрациями органических растворителей. При этом в диссертации представлены реальные подходы к получению таких биокатализаторов с демонстрацией всех стадий развития такой разработки.

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она написана четко, ясно, хорошим научным языком, хорошо оформлена и почти не содержит опечаток. Представленный в работе иллюстративный материал наглядно отражает полученные автором результаты.

Автореферат диссертации полностью отражает содержание текста диссертационной работы.

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении большого объема представленного экспериментального материала. Данная работа выглядит большой по числу примененных автором различных методов исследования и по числу проведенных экспериментов с большим массивом статистически обработанных данных. Научные положения, выводы, рекомендации и заключения, представленные в диссертации, сформулированы автором на основе реально полученных результатов. Выводы достаточно аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований. В этой связи следует отметить высокую **степень обоснованности и достоверности сделанных выводов и заключений.**

Вместе с этим в качестве замечаний можно отметить следующее:

- автор диссертации ошибочно в табл. 2 “Обзора литературы” говорит о том, что приводит свойства липаз, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*. По факту в табл.2 приведены продуценты липаз из бактериальных клеток **разных родов** (*Anoxybacillus, Bacillus, Alicyclobacillus*), но одного порядка – *Bacillales*;

- на рис.3 в разделе «Обзор литературы» дана неверная схема ферментативного гидролиза малатиона. По факту в этой реакции участвует одна молекула воды, а не две, и образуются не те продукты, что указаны, а тиол и диметилтиофосфорная кислота. Если бы образовывались 2 молекулы этанола, как указано в диссертации, то можно было бы контролировать накопление именно этанола, следя за реакцией гидролиза пестицида, что было бы значительно проще, чем определение остаточной концентрации малатиона, который извлекали из реакционной среды, используя гексан, согласно описанной методике на стр.43-44;

- в разделе «Материалы и методы» на стр.43 указано, что «степень иммобилизации фермента» вычисляли как процентное отношение активности получаемого биокатализатора к активности фермента, используемого для приготовления биокатализатора. Однако надо отметить, что активность биокатализатора измеряется в единицах активности, отнесенной на 1 **мг биокатализатора**, в составе которого присутствует и сшивающий агент, и сывороточный альбумин, тогда как активность фермента измеряется в единицах активности, отнесенной на 1 **мг белка** (стр.41). Правильнее было бы определять степень иммобилизации фермента как отношение по общему белку, взятому на иммобилизацию, и оставшемуся в растворе после проведения его иммобилизации в реакционном растворе – не в биокатализаторе. Тогда бы речь шла об одних и тех же единицах измерения соотносимых параметров по отношению к мг белка;

- не совсем ясным представляется результат автора, согласно которому стабильность исследуемой эстеразы (рис.14Б диссертации – он же рис.6Б в автореферате) при 60°C оказывается существенно более высокой, чем при 50°C. Так при 50°C фермент в течение 3 часов теряет 20% своей активности, тогда как при 60°C он её вообще не теряет в течение 4 часов. Причина не ясна и автором не обсуждается;

- в Списке литературы у ссылок №137 и 174, соответственно, не хватает информации об издательстве, поскольку это, вероятно, книга, и годе издания.

Отмеченные недочеты ни в коей мере не умаляют результатов работы в целом, тем более что они имеют большую научно-практическую значимость.

Результаты диссертации были представлены научной общественности на 9 международных и 1 российской конференциях и конгрессах. Основные положения диссертационной работы полноценно изложены в автореферате и отражены суммарно в 16 публикациях, в том числе в 5 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, и являются частью опубликованной монографии.

Резюмируя изложенное, следует заключить, что диссертационная работа Самойловой Ю.В., несомненно, является оригинальным экспериментальным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне, и представляет собой цельную законченную научно-квалификационную работу, которая вносит существенный вклад в развитие биотехнологии в области разработки новых высокостабильных биокаталитических систем и процессов, использующих иммобилизованные ферментные биокатализаторы, и в представлено новое решение актуальной научной задачи, связанной с разработкой новых биокатализаторов, обладающих эстеразной и липолитической активностью. Работа полностью соответствует паспорту специальности 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» в части п. 3 «...создание эффективных биопрепаратов и разработка способов их применения». Исходя из сказанного выше, считаю, что диссертационная работа Самойловой Ю.В по актуальности темы, объему выполненной работы, новизне полученных данных, важности разработанных

теоретических положений, надежности полученных результатов и обоснованности сделанных выводов и публикаций по полученным результатам полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. № 842 (в редакции от 01.10.2018). Автор диссертации - Самойлова Ю.В.- заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заведующая лабораторией экобиокатализа  
кафедры химической энзимологии Химического  
факультета ФГБОУ ВО «Московский  
государственный университет имени М.В.  
Ломоносова», доктор биологических наук,  
профессор

И.о. декана Химического факультета МГУ имени  
М.В. Ломоносова,  
член-корреспондент РАН, профессор

E-mail: [elena\\_efremenko@list.ru](mailto:elena_efremenko@list.ru)  
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1,  
строение 3, тел. [REDACTED] 70  
г. Москва, «22» марта 2018 г.

[REDACTED]  
Ефременко  
Елена Николаевна

[REDACTED]  
Калмыков  
Николаевич

