



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. Г.Б. ЕЛЯКОВА
Дальневосточного отделения Российской академии наук
(ТИБОХ ДВО РАН)

690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159;
Тел.: 7(423) 231-14-30; факс: 7(423) 231-40-50, электронная почта: office@piboc.dvo.ru, www.piboc.dvo.ru
ОКПО 02698170, ОГРН 1022502129540, ИНН 2539001223, КПП 253901001

№ 16/46-73 от 11.03.2019

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки
«Тихоокеанский институт
биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН
Врио директора ТИБОХ,
к.х.н., П.С. Дмитренко



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Самойловой Юлии Валерьевны «Изучение свойств бактериальных термостабильных липолитических ферментов и биокатализаторов в реакциях гидролиза и переэтерификации», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертация Самойловой Юлии Валерьевны «Изучение свойств бактериальных термостабильных липолитических ферментов и биокатализаторов в реакциях гидролиза и переэтерификации» представленной к защите на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология посвящена актуальной проблеме, касающейся создания новых биокатализаторов на основе природных липолитических ферментов из термофильных бактерий.

Благодаря прикладному значению термостабильные липолитические ферменты (липазы и эстеразы) микробного происхождения в настоящее время интенсивно изучаются мировой наукой. Прежде всего, научное внимание сфокусировано на биокатализаторах экстремофилов, на изучении их стабильности, новизне каталитических свойств. К относительно хорошо изученным ферментам относят липазы и эстеразы из термофильных мицелиальных грибов и дрожжей. Единичны сообщения о липазах бактериального происхождения.

Повышенный интерес исследователей к этим ферментам обусловлен перспективами применения их в пищевой, топливной, фармацевтической промышленности и в очистных сооружениях муниципальных сточных вод. Для многократного использования ферментов и отделения их от реакционной среды стараются иммобилизовать их на различных носителях. Применение биокатализаторов на основе липолитических ферментов позволит значительно повысить экологичность и энергоэффективность процессов за счет снижения концентрации токсичных отходов и температуры при перэтерификации растительных масел, при создании биодизельного топлива и т.п. В настоящее время широко применяются лишь коммерческие рекомбинантные липазы и эстеразы.

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки, Институте катализа им Г.К. Борескова СО РАН при финансовой поддержке грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-38-00425, № 18-38-00386), Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.512.11.0065) и гранта Президента РФ для ведущих научных школ НШ-6902.2016.3.

Диссертационная работа Самойловой Юлии Валерьевны изложена на 130 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы, 37 рисунков, список цитируемой литературы, включающий 254 статьи, и два приложения (2 стр.). Диссертация построена по традиционному плану: «Введение» (6 стр.), «Обзор литературы» (23 стр.), главы «Материалы и методы» (17 стр.), «Результаты и обсуждение» (46 стр.), «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы» и «Приложения».

В разделе «Введение» сформулированы задачи исследования, освещена актуальность, новизна полученных результатов и научно-практическое значение работы.

В разделе «Обзор литературы» анализируются вопросы, связанные с темой диссертации. Литературный обзор информативен и строго соответствует плану проведённых исследований. Он включает в себя большой и обстоятельный материал, лаконично изложенный в двух частях на двадцати трех страницах текста. В первой части обзора рассмотрены основные современные представления о номенклатуре и классификации, о природных источниках и свойствах бактериальных липолитических ферментов, а также о методах экспрессии их рекомбинантных белков. Ясному восприятию материала недостает хорошего иллюстрационного материала.

Основной акцент во второй части обзора направлен на методы создания искусственных биокатализаторов на основе именно бактериальных липолитических ферментов, применение этих биокатализаторов в современной биотехнологии и очистных сооружениях для биоразложения пестицидов в сточных водах. Литературный обзор демонстрирует хорошее знание автором результатов исследований в мире, включает основательную проработку литературных источников, опубликованных в последнее десятилетие.

В методической части содержится описание материалов и методов исследования, достаточное для воспроизведения экспериментов. Подробно описаны условия культивирования бактерий, используемых для скрининга. Примененные методы исследования отвечают современному методическому уровню, адекватны решаемым задачам. Что же касается современных физико-химических, молекулярно-генетических методов, методов компьютерного моделирования и других, то, при их внешней рутинности, они в каждом конкретном случае требуют от исследователя высокой научной квалификации.

При рассмотрении всего экспериментального материала диссертации Самойловой Юлии Валериевны обращает внимание широта охвата и масштабность самой работы с её новизной и очевидной практической значимостью. Диссертант следовал намеченному традиционному плану:

- Поиск новых термостабильных липолитических ферментов среди бактериальных изолятов компоста, их экспрессия в составе молекулярных векторов *E. coli* и изучение свойств;
- Разработка биокатализаторов на основе новых рекомбинантных липолитических ферментов путем различных способов иммобилизации;
- Изучение возможности применения полученных биокатализаторов в различных биотехнологических процессах.

Современные исследования, сосредоточенные на получении высокоактивных липолитических ферментов, направлены либо на улучшение свойств известных ферментов методами геной биоинженерии, либо на поиске новых представителей у природных продуцентов. Фундаментом всей большой и многоплановой работы Самойловой Юлии Валериевны является, прежде всего, поиск источников нужных ферментов среди 46 культур микроорганизмов, выделенных из образцов компоста, которые собраны в различных районах Новосибирской области и Республики Тыва.

Диссертантом проведено выделение пятнадцати термофильных бактериальных изолятов, проявляющих наиболее высокую липолитическую активность. Выполнена идентификация этих штаммов. Штамм *Ureibacillus thermosphaericus* оказался перспективным продуцентом термофильной щелочной эстеразы. Ген эстеразы estUT1 был клонирован и экспрессирован в *E. coli* BL21(DE3), исследованы основные свойства и субстратная специфичность этого рекомбинантного высокотермостабильного фермента. Следует отметить, что получение и очистка индивидуальных рекомбинантных ферментов является значительным вкладом в науку о бактериальных липолитических ферментах. Показано, что эстераза estUT1 долгое время сохраняет активность в присутствии органических растворителей, что важно для практического применения фермента.

На практике экспрессия липолитических ферментов в известных к настоящему времени системах является проблемой из-за низкого выхода активных термостабильных ферментов. Ферменты экспрессируются в виде телец включения, что требует применения дополнительной стадии рефолдинга *in vitro*. Диссертантом подобраны шапероны, обеспечивающие увеличение удельной активности рекомбинантного фермента в растворимой фракции белка клеточного лизата *E. coli* BL21(DE3). Это позволило получить активный фермент, минуя стадию ренатурации белка из телец включения.

С использованием метода поперечной сшивки ферментных агрегатов получен биокатализатор CLEA-estUT1, превосходящий исходный фермент термостабильностью, удельной активностью и операционной стабильностью в реакции гидролиза инсектицида малатиона в стерилизованных муниципальных сточных водах. И, наконец, в результате биоинформатического анализа аминокислотной последовательности и моделированию пространственной структуры фермента установлено, что эстераза estUT1 является первым охарактеризованным представителем нового, XVIII семейства липолитических ферментов. Теоретически

предсказаны и методом точечной мутации показаны функционально значимые остатки активного центра фермента.

Кроме того, Диссертантом впервые получен новый высокостабильный биокатализатор БКЛ путем ковалентной иммобилизации термостабильной рекомбинантной липазы из бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3 на мезопористом силикагеле. Со средней эффективностью БКЛ участвует в реакциях метанолиза и переэтерификации растительных масел и может найти применение при получении как компонентов биодизельного топлива, так и модифицированных пищевых жиров.

Все выводы диссертации обоснованы и базируются на обширном экспериментальном материале.

Очень хорошее впечатление производит раздел, посвященный оптимизации условий приготовления биокатализатора CLEA-estUT1 путем поперечной сшивки с использованием теоретической статистической модели, созданной на основе методологии отклика поверхности. С помощью модели были подобраны оптимальные концентрации осадителя и сшивающего агента, а также время иммобилизации, при которых активность фермента была максимальной, а его потери минимальны. Экспериментальное тестирование показало высокую корреляцию полученной статистической модели с экспериментальными данными. Биокатализатор CLEA-estUT1, синтезированный в предсказанных моделью условиях, проявлял заметную устойчивость к ряду химических веществ и высокую эксплуатационную стабильность в реакции гидролиза малатиона в сточных водах. После 25 циклов гидролиза малатиона при 37°C биокатализатор CLEA-estUT1 сохранял половину активности от исходной, что делает его пригодным для разложения инсектицидов в промышленных масштабах.

Содержание автореферата и опубликованных печатных работ соответствует материалу представленной диссертации. По материалам диссертационной работы опубликовано 16 печатных работ: две статьи

напечатаны в журналах «Extremophiles» (IF - 2,0) и «Catalysts» (IF - 3,465) издательства «Springer» и «MDPI», индексируемых в базах «Web of Science» и «Scopus» соответственно; три статьи опубликованы в отечественном журнале «Катализ в промышленности», входящий в «Перечень периодических научных и научно-технических изданий, выпускаемых в РФ, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени» (импакт-фактор РИНЦ – 0,945). С участием диссертанта написана 1 монография, а также опубликовано 10 тезисов в сборниках докладов научных конференций. Основные результаты работы доложены и обсуждены на Международных и Российских научных симпозиумах, и конференциях.

Таким образом, диссертант с поставленными перед ним задачами справился. Полученные результаты не вызывают сомнений. Однако диссертация не лишена недостатков, касающихся, главным образом, стиля изложения и оформления:

В главе «Обзор литературы» иногда встречаются фразы с пропущенными словами, несогласованными членами предложения, некрасивыми стилистическими оборотами.

В главе «Материалы и методы» В формулировке определения ферментативной активности эстеразы estUT1 не указан коэффициент молярной экстинкции пара-нитро-фенола при 405 нм и рН 8,0. Активность эстеразы estUT1 определяли не «спектрофотометрией», как пишет Диссертант, а по количеству выделившегося продукта реакции п-нитро-фенола, которое определяли спектрофотометрически, измеряя на спектрофотометре оптическую плотность реакционной смеси при 405 нм, при рН 8,0 ($\epsilon_{405} = 17600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Это видно из статьи, в которой диссертант является первым автором.

Если реакцию останавливали охлаждением на льду, то при какой температуре измеряли оптическую плотность реакционной смеси при 405

нм? Также на льду? Судя по представленным результатам (рис. 14), эстераза estUT1 сохраняет 30% при 30°C, но не показано, при какой температуре реакция останавливается.

Стр. 35, таблица 4 не сделаны подстрочные индексы $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Стр. 40 название *SDS-PAGE* белков, следовало сделать на русском

Стр. 42. Стабильность эстеразы estUT1 определяли, выдерживая фермент в буферах с различными значениями pH при температуре 50 °C в течение 1 ч. Нужно добавить «pH» стабильность. Результат выражали в виде графика относительной активности, где активность эстеразы до прогрева была принята за 100%. Что значит до прогрева, когда речь идет о pH?

В списке цитируемой литературы, оформленном по ГОСТу, во всех английских изданиях том (Т) и номер (№), а также страницы (С) написаны по-русски. В библиографии 30 ссылок из 254 содержатся ошибки. Это ссылки №№ 1, 2, 6, 10, 15, 17, 22, 26, 35, 69, 75, 80, 84, 101, 124, 130, 137, 165, 174, 188, 213, 220, 224, 230, 235, 237, 238, 240, 245, 252.

Однако, высказанные замечания не носят принципиального характера, а являются результатом невероятной спешки при оформлении рукописи диссертации.

Подводя итог вышеизложенному, можно сделать следующее заключение: диссертация Самойловой Юлии Валерьевны представляет собой законченную научно-исследовательскую работу. Выводы и научные положения, сформулированные в диссертации, полностью соответствуют результатам исследования и аргументированы. Результаты отражены в 5 статьях в реферируемых журналах, апробированы и обсуждены на 10-ти научных конференциях. По актуальности темы, полноте поставленных и решенных задач, совокупности новых научных результатов и научно-практической значимости представленная диссертационная работа отвечает требованиям действующего «Положения о порядке присуждения учёных

степеней» ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (Постановление Правительства РФ от 04.09.2013 г. № 842, с изменениями Постановление Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, 02.08.2016 № 748, 29.05.2017 № 650), а ее автор, Самойлова Юлия Валерьевна, заслуживает присуждения ей степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв подготовил

Ведущий научный сотрудник

Доктор химических наук, доцент,  (Бакунина Ирина Юрьевна)

Отзыв заслушан и утвержден на заседании расширенного совместного семинара лабораторий химии ферментов и морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН, протокол № 115, от «11» марта 2019 года.

Председатель семинара,

Заведующий лабораторией химии ферментов,

Доктор химических наук, доцент,  (Ермакова Светлана Павловна)

Секретарь семинара,

Научный сотрудник,

Кандидат химических наук,  (Маляренко Олеся Сергеевна)