

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Гордеевой Татьяны Леонидовны на диссертацию Бытяк Дениса Сергеевича «Разработка биотехнологии рекомбинантной фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii*», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1 Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Бытяк Д.С. посвящена получению отечественного ферментного препарата фосфолипазы A2 (PLA2, EC 3.1.1.4), катализирующей гидролиз глицерофосфолипидов в положении *sn*-2 с образованием свободных жирных кислот и лизофосфолипидов, и широко используемой в масложировой, фармацевтической и нефтеперерабатывающей промышленности.

В 2002 году была обнаружена первая бактериальная PLA2, секретируемая *Streptomyces violaceoruber* A-2688, которая обладала промышленно-ценными свойствами. Однако, продуктивность природного штамма *S. violaceoruber* была низка, что не давало возможности применить его для промышленного получения PLA2. Получение рекомбинантных штаммов позволяет увеличить выход целевого фермента. Так, продуктивность рекомбинантного штамма *Streptomyces* sp., продуцирующего фосфолипазу A2 из *S. violaceoruber*, позволила получить препарат «PLA2 Nagase» (Nagase Corporation, Япония). Однако, в настоящее время санкции, введенные против РФ, не позволяют использовать зарубежные препараты.

Рекомбинантные штаммы *K. phaffii* широко используются для промышленного получения ферментных препаратов, так как способны быстро накапливать большое количество биомассы при ферментации на минимальных средах, а также секретировать высокие уровни целевого рекомбинантного белка, что делает их промышленное применение для получения ферментов экономически эффективным. Однако, технологии

получения фосфолипаз А2 с использованием рекомбинантных штаммов *K. phaffii* в настоящее время не разработано.

Таким образом, описанная в диссертации разработанная отечественная биотехнология получения рекомбинантной фосфолипазы А2 из *S. violaceoruber* в *K. phaffii*, несомненно актуальна и имеет большое практическое значение.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа изложена на 146 страницах машинописного текста, состоит из введения; пяти глав, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения; заключения; списка используемой литературы (113 наименования) и четырех приложений. Текст диссертации содержит 42 рисунка, 55 таблиц и 14 формул.

Работа построена логично и оформлена в соответствии с требованиями ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Во **введении** приводятся данные об актуальности и степени разработанности темы диссертационной работы, определены цель и задачи исследования, отражены научная новизна, практическая значимость, а также сведения об апробации работы на различных научных конференциях и публикациях по теме диссертации.

В **литературном обзоре (глава первая)** представлены сведения о классификации фосфолипаз, свойствах фосфолипазы А2 и ее промышленном применении. Приведен анализ способов получения фосфолипазы А2 и перспективных экспрессионных систем. Рассмотрены дрожжевые экспрессионные системы и метаболические особенности *K. phaffii*. Проведенный соискателем анализ литературных данных показывает перспективность выбранного направления работ.

Глубокая проработка литературы позволила автору обосновано подойти к выбору объектов и методов исследования, которые представлены во **второй главе материалы и методы**. В качестве объектов исследования в

работе рассмотрены дрожжевые и бактериальные штаммы микроорганизмов. В работе использованы современные молекулярно-биологические и физико-химические методы исследования, свидетельствующие о высоком научном уровне полученных экспериментальных данных.

Глава третья содержит **результаты и обсуждения** исследований диссертанта, направленные на получение генно-инженерно-модифицированных штаммов. На первом этапе автором получен ауксотрофный штамм *K. phaffii* YIB- Δ leu2, не способный к росту на питательных средах без лейцина. Далее соискателем показан способ получения штамма-продуцента *K. phaffii* YIB Δ leu2_PLA2Sv, обеспечивающего экспрессию фосфолипазы A2 непосредственно в культуральную жидкость. Представлены результаты молекулярно-генетического и морфологических исследований полученного штамма.

Четвертая глава содержит **результаты и обсуждения** исследований диссертанта условий upstream и downstream процессов. В этой главе установлены параметры растворимости применяемой питательной среды, в том числе предложен комбинированный состав питательной среды, включающий в себя минеральные соли и кукурузный экстракт. Диссертантом представлены результаты определения параметров культивирования методом RSM, посредством математического моделирования в ПО MODDE, с последующей апробацией в лабораторных условиях. Автором предложено и научно-обосновано применение керамических фильтрационных моделей, с целью обеспечения очистки и концентрирования фосфолипазы A2.

Пятая глава результатов и обсуждений посвящена исследованию физико-химических и потребительских свойств полученной фосфолипазы A2. Дана оценка влияния температуры и pH на ферментативную активность. Исследована стабильность полученного ферментного препарата в течение 12 месяцев и показано соответствие ключевых характеристик разработанной

фосфолипазы A2, характеристикам зарубежных аналогов. Экспериментально подтверждена применимость разработанной фосфолипазы A2 при ферментации яичного желтка и получении майонезной пищевой продукции.

В **заключении** обобщены основные результаты исследований и сформулированы основные научные и практические положения диссертации. Приведенные результаты и выводы диссертации свидетельствуют о достижении поставленной цели и решении сформулированных задач исследования.

Научная новизна, научная и практическая значимость

Научная новизна заключается в том, что автор на основе разработанного им ауксотрофного штамма-реципиента *K. phaffii* YIB Δ*leu2* сконструировал новый безмаркерный рекомбинантный штамм *K. phaffii* YIB Δ*leu2*_PLA2Sv – продуцент фосфолипазы A2 из *S. violaceoruber*. Продуктивность полученного штамма позволяет использовать его для промышленного получения фосфолипазы A2.

Автором впервые разработана промышленная технология получения препарата фосфолипазы A2 с использованием рекомбинантного штамма на основе дрожжей *K. phaffii*, в которой были впервые применены следующие технические решения: использование ПолиДАДМАХ для очистки ферментного препарата от ДНК штамма-продуцента; применение керамических фильтрационных модулей Tamі, селективностью 10 кДа, для обеспечения концентрирования и получения ферментного препарата активностью 17979 ед/мл; разработана и предложена методика оценки остаточной ферментативной активности фосфолипазы A2 (Свидетельство №142/09-01.00272-2020).

Полученный в ходе работы ферментный препарат рекомбинантной фосфолипазы A2 по своим характеристикам не уступает мировым аналогам, что было успешно подтверждено при его испытании в ферментации яичного желтка в процессе производства майонезной продукции. Получены опытно-

промышленные партии пищевой продукции в производственных условиях ГК «ЭФКО».

В целом, работа Бытак Д.С. оставляет положительное впечатление. Диссертантом представлен существенный массив экспериментальных данных, полученный в ходе тщательно спланированных, логически связанных экспериментов, должным образом обработанный с применением современных методов математического анализа и статистической обработки. Все поставленные задачи исследования выполнены в полном объеме. Работа обладает внутренней логикой и хорошо проиллюстрирована. Положения, выносимые на защиту, подтверждены результатами диссертационной работы. Результаты исследований Бытак Д. С. опубликованы в виде 11 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России, 2 статьи из международных баз данных Scopus и Web of Science, получено 2 патента РФ, 3 материала международных и национальных научных конференций и 1 свидетельство об аттестации методики измерений.

Замечания и вопросы

В качестве замечаний и пожеланий можно отметить следующие:

1. Текст написан небрежно, присутствуют множественные опечатки, стилистические неточности, например, ссылки должны ставиться до точки в предложениях; название рода и вида микроорганизма всегда пишется курсивом (например, в п. 1.6); родовые названия *Komagataella phaffii* в тексте пишутся полностью только при первом упоминании, затем сокращенно *K.*; используемый вектор следует писать *pPIC9*, а не *pPic9* (раздел 3.2); названия сайтов рестрикции (например, в разделе 2.2.2) следует писать курсивом только первые три буквы названия *EcoRI*, а не *EcoRI*.

2. В разделе “актуальность” не отображено происхождение фосфолипазы A2 (организм-донор), нет обоснования выбора данной

фосфолипазы, а также не приводится ссылка на аминокислотную последовательность используемой фосфолипазы A2.

3. Подробное описание конструирования плазмид следовало бы изложить в разделе Материалы и Методы, а не в разделе 3 «Результаты и Обсуждение».

4. На рис. 3.2.2 не указан сайт *Bgl*II, что затрудняет идентификацию местоположения сайта рестрикции для линейаризации плазмиды.

5. На рисунке 3.2.3 приведен маркер молекулярной массы белков, но значения молекулярных масс не приведены на рисунке 3.2.3.

6. В разделе 3.2 не указано, какой трансформант был выбран в качестве штамма Y-4513.

7. В разделе 3.3 следует писать не ген белка ppMF, а нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид α -фактора *Saccharomyces cerevisiae*.

8. Поясните, почему удельная активность рекомбинантной фосфолипазы A2, полученной в ходе Вашей работы, составляет 2093 ед/мг против 170 ед/мг, полученной для аналогичного фермента в работе A. Liu et. al. 2015?

9. Поясните преимущество разработанной Вами методики определения фосфолипазной активности.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

Заключение

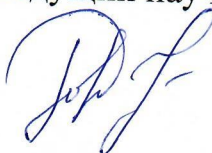
Диссертационная работа Бытак Д. С. выполнена на актуальную тему, имеет научную новизну, теоретическую и практическую значимость, является завершенным научным трудом. Диссертация полностью соответствует критериям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., ред. № 62 от 05.01.2024 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а

ее автор, Бытяк Денис Сергеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1 – Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИЦ «Курчатовский институт»

Гордеева Татьяна Леонидовна



Подпись 19.07.24 Дата

Контактные данные:

+7(915)-197-85-95 tatiana.gordeeva@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.02.07 - Генетика

Адрес места работы:

123182, Москва, пл. Академика Курчатова 1.

Почтовый адрес: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд 1.

Тел.: +7 (495) 315-37-47; e-mail: tatiana.gordeeva@mail.ru

Подпись Гордеевой Т.Л. заверяю:

Главный ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»



Борисов Кирилл Евгеньевич