

В диссертационный совет
Д24.2.287/02
при ФГБОУ ВО «Воронежский
государственный университет
инженерных технологий»

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора химических наук Сеницына Аркадия Пантелеймоновича на диссертационную работу Бытяк Дениса Сергеевича на тему «Разработка биотехнологии рекомбинантной фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii*», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1 – Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ.

Актуальность работы. Проблема получения ферментов и ферментных препаратов с целью последующего применения в различных отраслях промышленности, в том числе в пищевой промышленности, в настоящее время является актуальным направлением развития биотехнологии. Очевидно, что использование генно-инженерно-модифицированных штаммов обеспечивает более высокий уровень продукции целевых ферментов, чем нативные штаммы. Так фосфолипаза A2, полученная путем микробного синтеза широко применяется на пищевых предприятиях Российской Федерации, однако отечественное производство данного фермента отсутствует, в связи с чем для пищевого производства критически важно обеспечить разработку технологии получения отечественного ферментного препарата высокоактивной фосфолипазы A2, в том числе в рамках повышения продовольственной безопасности страны и развития потенциала импортозамещения ферментативной продукции. Следует подчеркнуть, что автором создан не только штамм-продуцент фосфолипазы A2, но и комплексная технология получения стабильного ферментного препарата, обладающего высокой фосфолиполитической активностью. Важность проведенных исследований подтверждается также получением на базе ООО «ИЦ «Бирюч-НТ» пищевой продукции с использованием наработанной фосфолипазы A2. В связи с этим тема диссертационной работы Бытяк Д.С., направленной на разработку

биотехнологии рекомбинантной фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii*, является актуальной.

Научная новизна исследования и полученных результатов состоит в том, что автором впервые получен штамм дрожжей *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2, ауксотрофный по лейцину, и доказано возможность его использования в качестве штамма-реципиента для получения штамма-продуцента фосфолипазы A2. Создан и охарактеризован штамм *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2_PLA2Sv, обеспечивающий синтез рекомбинантной фосфолипазы A2 и секрецию её в культуральную жидкость. Установлено, что содержание метанола в среде от 0,6 % до 2 % способствует индукции AOX1 промотора и синтезу рекомбинантного белка при культивировании *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2_PLA2Sv. Впервые определены параметры культивирования *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2_PLA2Sv, обеспечивающие получение не менее 1,87 г/л фосфолипазы A2. Обосновано применение системы тангенциальной ультрафильтрации Tami (10 кДа), что позволило получить жидкий ферментный препарат с активностью фосфолипазы A2 17979 ед/мл. Автором исследованы физико-химические характеристики произведенного ферментного препарата, в том числе показано, что при значениях pH 8,5 и температуре 50 °C, фосфолипаза A2 обладает наибольшей ферментативной активностью. Продемонстрировано, что через 12 месяцев хранения жидкого ферментного препарата, активность составляет более 10 500 ед/мл. Бытак Д. С. было получено 2 патента РФ и 1 свидетельство об аттестации методики измерений.

Объект и предмет диссертационного исследования соответствуют паспорту специальности 2.7.1 – Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ.

Практическая значимость работы вполне очевидна. Созданный штамм *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2_PLA2Sv позволяет получать высокоактивный ферментный препарат фосфолипазы A2. Разработана технология получения такого препарата фосфолипазы A2, который может применяться предприятиями пищевой промышленности. В результате проведения исследований установлено, что созданный препарат фосфолипазы A2 может использоваться с целью ферментации яичного желтка, применяемого при производстве майонезной

пищевой продукции высокого качества. Показано, что физико-химические и потребительские характеристики ферментного препарата, полученного в ходе выполнения диссертационного исследования, не уступают зарубежным аналогам и могут быть интегрированы в промышленное производство. Практическая значимость подтверждена патентами РФ: RU2746817C1 «Способ получения штамма-продуцента фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii* Y1B, *Δleu2 PLA2Sv*» и RU2676321C1 «Способ получения ферментного препарата фосфолипазы A2 с применением рекомбинантного штамма-продуцента *Pichia pastoris* X-33 *pPICZαA-PhoA2-StV*». Разработанная автором технология получения фосфолипазы A2 внедрена на базе ГК «ЭФКО».

Оценка содержания работы, ее завершенность. Диссертационная работа изложена на 146 страницах машинописного текста; состоит из «Введения», «Обзора литературы», главы с изложением материалов и методов исследования и трёх глав, посвящённым изложению и обсуждения экспериментальных результатов, «Заключения» и «Списка используемой литературы», содержащего 113 источников, в том числе 110 на иностранных языках. Иллюстративный материал включает 42 рисунка, 55 таблиц и 14 формул. Диссертационная работа включает 4 приложения.

Во введении автором обоснована актуальность темы диссертационной работы, обозначены цель и задачи исследований, их научная новизна и практическая значимость выполнения исследований, представлены основные положения, выносимые на защиту диссертации.

В первой главе выполнен обзор литературных источников, касающихся получения ферментных препаратов и применения фосфолипазы A2 в пищевой промышленности. Автором показано отсутствие информации о получении фосфолипазы A2, посредством культивирования генно-инженерного штамма *Komagataella phaffii*. Рассмотрены метаболические особенности *Komagataella phaffii* и способы культивирования, с целью получения рекомбинантных белков.

Во второй главе описаны объекты исследования, дрожжевые и бактериальные штаммы микроорганизмов и материалы, применяемые при проведении настоящего исследования. Подробно изложены аналитические, микробиологические и физико-химические методы исследования.

В третьей главе представлены результаты исследований по созданию штамма-продуцента фосфолипазы A2. Изложены результаты, полученные с применением методов молекулярно-генетической инженерии для получения ауксотрофного штамма *Komagataella phaffii* YIB- Δ leu2 и получения штамма-продуцента фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2 PLA2Sv, с восстановленной прототрофностью.

В четвертой главе изложены результаты, направленные на разработку технологии получения фосфолипазы A2, посредством культивирования штамма-продуцента *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2 PLA2Sv, с последующим концентрированием и очисткой. Представлены результаты определения оптимальных параметров, на основании построения моделей поверхностного отклика, с применением программного обеспечения MODDE 12.

В пятой главе описаны физико-химические свойства ферментного препарата «Фосфолипаза A2», полученного в ходе выполнения диссертационной работы. Проведено сравнение ключевых характеристик разработанного ферментного препарата с зарубежными аналогами. Показаны результаты практического применения разработанного ферментного препарата в процессе глубокой переработки яичного желтка, с целью повышения его эмульгирующих свойств. С использованием ферментного препарата «Фосфолипаза A2» на базе ООО «ИЦ «Бирюч-НТ» наработана партия пищевой продукции (жидкий яичный желток, ферментированный с солью).

Выводы и заключения сформулированы согласно результатам диссертационных исследований.

На основании комплексных экспериментальных и теоретических исследований разработаны ауксотрофный штамм-реципиент *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2 PLA2Sv, штамм-продуцент фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2 PLA2Sv, разработана технология получения высокоактивной фосфолипазы A2 и проведена апробация разработанного ферментного препарата при получении майонезной пищевой продукции, в производственных условиях.

В приложении к диссертационной работе включены акты наработки экспериментальной партии пищевой продукции, протоколы оценки качества пищевой продукции, полученной с использованием фермента фосфолипазы A2,

программа испытаний на соответствие техническим требованиям пищевой продукции, а также свидетельство об аттестации методики измерений остаточной активности фермента фосфолипаза А2 титриметрическим методом и справки о депонировании полученных штаммов.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и предложений. При разработке научных положений, изложенных в диссертационной работе, рекомендаций и выводов, автор опирался на основные принципы физико-химических, математических и микробиологических исследований. Применяемые молекулярно-генетические и технологические подходы хорошо согласуются с уже известными данным, полученным в различных областях биотехнологии. Представленные в работе научные положения, рекомендации и выводы, обоснованы и подтверждены экспериментальными данными, в том числе в ходе опытно-промышленной апробации.

В работе автором использовались современные методы экспериментальных исследований. Степень достоверности результатов диссертационной работы подтверждается тщательной проработкой литературных источников по теме исследования, применением современных инструментальных методов анализа, публикацией основных положений диссертации в отечественных и зарубежных изданиях с высоким уровнем цитируемости.

Достоверность научных результатов подтверждены автором наличием соответствующих патентов на изобретения, справками о депонировании разработанных штаммов, а также актами наработки и исследования экспериментальной продукции на базе ГК «ЭФКО».

Результаты работы представлялись автором на международных конференциях в Воронеже, Белгороде, Пущино.

Основные выводы по диссертационной работе являются достоверными и полностью основаны на результатах теоретических и экспериментальных исследований автора.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Выводы и рекомендации, приведенные в работе, имеют существенную значимость для

науки и практической биотехнологии, которая заключается в разработке технологии получения рекомбинантных белковых продуктов на базе *Komagataella phaffii*. По теме диссертации автором опубликовано 11 работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России, в том числе 2 статьи из международных баз данных Scopus и Web of Science, 2 патента РФ, 3 материала международных и национальных научных конференций и 1 свидетельство об аттестации методики измерений.

Автореферат, изложенный на 20 страницах, отражает основные положения и выводы диссертации. Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с требованиями ВАК РФ.

Замечания по тексту диссертации. К работе имеется ряд замечаний:

1. Описание состава питательной среды (таблице 4.1.1) необходимо было поместить в раздел «Материалы и методы».
2. В разделе 4.7 следовало указать как проводилась очистка культуральной жидкости от биомассы, перед концентрированием.
3. Обращает на себя внимание отсутствие в разделе 4.9. аналитических результатов подтверждения отсутствия ПолиДАДМАХ в растворе ферментного препарата.
4. При указании продуктивности полученного штамма, в соответствии с разработанной технологией, было бы целесообразно представить показатели продуктивности зарубежных аналогов. Эта информация могла бы повысить практическую значимость исследования.
5. По тексту диссертации имеются орфографические ошибки.

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают общей положительной оценки диссертации.

Заключение

Анализ материалов исследований, выводов и рекомендаций показал, что по научному уровню, новизне, объему полученных аналитических и экспериментальных результатов, теоретической и практической значимости, диссертация Бытяк Д.С. «Разработка биотехнологии рекомбинантной фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii*», на соискание ученой степени кандидата

технических наук является завершенной и самостоятельной научно-квалификационной работой.

Выполненная диссертационная работа в полной мере соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» и паспорту специальности 2.7.1 – Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ, по которой представлена к защите, а её 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:

доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией физико-химии
ферментативной трансформации полимеров
химического факультета ФГБОУ ВО «МГУ
имени М. В. Ломоносова»


А. П. Синицын
06.08.2024 г.

Почтовый адрес:

119234, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1-3

E-mail: dekanat@chem.msu.ru

Тел. +7 (495) 939-16-71

