

**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

**федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«Российский биотехнологический  
университет  
(РОСБИОТЕХ)»  
(ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»)**

Волоколамское шоссе, дом 11, Москва, 125080  
Тел. (499)750-01-11 (доб. 65-67)  
E-mail: [info@rbtu-mgupp.ru](mailto:info@rbtu-mgupp.ru); web: [rbtu-mgupp.ru](http://rbtu-mgupp.ru)  
ОКПО 02068634; ОГРН 1037739533699  
ИНН/КПП 7712029651/774301001

«15» 08.2024 № 04.02-16/12

на № \_\_\_\_\_

**УТВЕРЖДАЮ**

**Проректор по научной работе  
ФГБОУ ВО «Российский  
биотехнологический университет  
(РОСБИОТЕХ)»**

**д-р психол. наук, проф.,  
чл.-кор. РАО Ефремова Г.И.**



2024 г.

**ОТЗЫВ**

**ведущей организации**

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» (ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ») на диссертационную работу Бытяк Дениса Сергеевича «Разработка биотехнологии рекомбинантной фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii*», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1 – Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ

**Актуальность темы выполненной работы и ее связь с соответствующими отраслями науки и практической деятельности**

В настоящее время приоритетным направлением государственной политики Российской Федерации является обеспечение производственной безопасности страны. Учитывая возрастающее ограничение доступа России к мировым рынкам и технологиям, все более остро возникает необходимость импортозамещения и развития собственных высокоэффективных пищевых технологий, в том числе технологий получения ферментных препаратов.

Фосфолипаза A2 находит широкое применение в пищевой продукции. При этом специалисты области все больше отдают предпочтение фосфолипазам, полученным путем микробного синтеза, обладающим наиболее высокой целевой субстратной специфичностью и низкими побочными активностями. Анализ рынка ферментов показал, что на территории Российской Федерации отсутствует производство фосфолипазы A2.

В этой связи диссертационная работа Бытяк Дениса Сергеевича безусловно актуальна, так как автором рассматривается ряд важнейших вопросов, связанных с совершенствованием экспрессионных систем на базе *Komagataella phaffii*,

повышением эффективности синтеза рекомбинантных белков и разработки эффективной технологии получения высокоактивной фосфолипазы A2.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Методами генетической инженерии разработан штамм-продуцент фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii* YIB  $\Delta$ ley2\_PLA2Sv, депонированный в ВКПМ (Y-4513). Определены параметры культивирования разработанного штамма, обеспечивающие эффективный синтез PLA2.

Исследованы физико-химические характеристики полученной фосфолипазы A2, установлено влияние температуры и pH на ферментативную активность. Впервые показано применение ПолиДАДМАХ с целью очистки ферментного препарата от ДНК штамма-продуцента. Показана применимость фосфолипазы A2, полученной на базе *Komagataella phaffii*, при ферментации яичного желтка в процессе производства майонезной продукции.

Разработан способ получения штамма-продуцента фосфолипазы A2 (Пат. RU2746817C1). Разработана технология получения фосфолипазы A2 с применением дрожжевого штамма-продуцента (Пат. RU2676321C1).

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

### **Практическая значимость**

Разработана и обоснована технология получения высокоактивной фосфолипазы A2, предусматривающая глубинное культивирования полученного штамма-продуцента с последующей очисткой и концентрированием. Чистота изобретения подтверждается патентом RU2676321C1.

Разработана и предложена методика оценки остаточной ферментативной активности фосфолипазы A2 (Свидетельство №142/09-01.00272-2020).

Экспериментальными методами установлены физико-химические характеристики полученной фосфолипазы A2, в том числе определены условия, обеспечивающие наибольшую ферментативную активность.

На основании результатов диссертационной работы получены опытно-промышленные партии пищевой продукции в производственных условиях ГК «ЭФКО».

### **Оценка содержания работы, ее завершенность**

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы из 113 источников и четырех приложений. Объем диссертации составляет 146 страниц машинописного текста.

Во введении изложена актуальность вопроса, поставлены основные задачи, решаемые автором, и основные результаты по этим задачам. Представлены общая мотивировка решаемых задач, научная новизна и практическая значимость.

**В первой главе** традиционно расположен литературный обзор по теме исследования. Отражены сведения о существующих способах получения фосфолипазы A2. Проведен анализ применяемых дрожжевых экспрессионных систем для синтеза рекомбинантных белков, и представлены сведения о ключевых метаболических особенностях *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris* или *Komagataella phaffii*).

**Во второй главе** представлены объекты и методы исследования, применяемые в ходе выполнения диссертационного исследования, в том числе сведения о применяемых бактериальных и дрожжевых штаммах.

**В третьей главе** представлены результаты получения ауксотрофного штамма *Komagataella phaffii* YIB- $\Delta$ leu2 и дальнейшее его использование в качестве реципиента при получении штамма-продуцента фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii* YIB  $\Delta$ ley2\_PLA2Sv.

**В четвертой главе** раскрыты результаты исследования при подборе условий культивирования разработанного штамма-продуцента и условий выделения и очистки целевого белка фосфолипазы A2.

**В пятой главе** представлены результаты исследования свойств полученного фермента фосфолипазы A2, в том числе показана применимость разработанного фермента при производстве пищевой продукции.

В заключении представлены основные выводы, которые логично резюмируют приведенные в диссертации материалы исследований, полностью отвечают на вопросы, поставленные в цели и задачах работы.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и предложений**, полученных в работе, подтверждается использованием комплекса независимых взаимодополняющих современных экспериментальных методов исследования, большим объемом экспериментальных данных, согласованностью теоретических подходов с результатами практических экспериментов.

Результаты исследований Бытык 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.

**Автореферат** диссертации и публикации соискателя полностью отражают содержание диссертации. Диссертация и автореферат по структуре и оформлению соответствуют требованиям ВАК РФ и «Положению о присуждении ученых степеней».

#### **Замечания по тексту диссертации.**

В качестве замечаний и пожеланий можно отметить следующие:

1. в разделе 4.2 отсутствует сравнительная характеристика экономического эффекта от замены биотина на дрожжевой экстракт. Данная информация способна повысить понимание значимости исследования;
2. на рисунке 4.4.2. отсутствуют полные данные удельной скорости потребления глицерина в течение всего процесса культивирования;

3. очевидно, что синтез целевого белка под управлением рАОХ1 индуцируется метанолом, однако в разделе 4.5 следовало представить данные, отражающие эффективность синтеза как в культуральную жидкость, так и внутриклеточно;

4. обращает на себя внимание то, что в разделе 4.6 отсутствуют данные об исследовании применимости полуволоконных фильтрационных систем или других, кроме керамических, для ведения тангенциальной ультрафильтрации;

5. в п. 4.5 работы приведена формула 4.5.1 для расчета количества метанола, требуемого для индукции АОХ1 промотора. Насколько данная формула применима для использования в биотехнологии рекомбинантных белков, полученных на основе других штаммов *Komagataella phaffii* или формула применима только к использованному в работе штамму? Также из текста работы не ясно, в каких единицах измерения получается показатель М;

6. в работе не показана стабильность нового рекомбинантного штамма *Komagataella phaffii*, проверялась ли данная характеристика для сконструированного штамма?

7. согласно п. 7 положений, выносимых на защиту, в тексте диссертации необходимо было привести экспериментальные данные, касающиеся применения ферментированного яичного желтка, полученного при помощи ферментного препарата PLA2 при выработке майонеза. Указанные результаты позволили бы повысить практическую значимость работы;

8. в работе при определении качественных показателей ферментированного яичного желтка и оценке их соответствия, опираясь на требования ГОСТ 30363-2013, были допущены следующие технические неточности: 1) массовая доля сухого вещества в желтке должна составлять не менее 43,0 %; 2) массовая доля белковых веществ – не менее 15,0 %. Не нормируется массовая доля хлористого натрия, массовая доля свободных жирных кислот нормируется только у сухого меланжа. Следовало бы пояснить, по каким соображениям были исследованы данные показатели. По ГОСТ 30363-2013 нормируется рН и содержание β-оксимасляной кислоты в пересчете на сухое вещество (мг/кг, не более), в работе данные показатели не определены;

9. в работе имеются опечатки, редакционные ошибки.

Приведенные замечания не снижают положительной оценки диссертационной работы.

### Заключение

На основании вышеприведенного можно заключить, что диссертация Бытак Дениса Сергеевича соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по действующему «Положению о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1 – Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ.

Отзыв на диссертацию заслушан и утвержден на заседании кафедры биотехнологии и технология продуктов биоорганического синтеза ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» (протокол № 34 от «12» 08 2024 г.).

**Сведения о ведущей организации:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

Адрес: 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, дом 11

Тел.: +7 (499) 750-01-11

Электронная почта: mgupp@mgupp.ru

<https://www.mgupp.ru>

### Отзыв составили

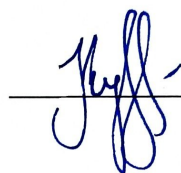
Зав. кафедрой «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза», кандидат технических наук, доцент

Почтовый адрес:

125080, г. Москва, ул. Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: kulikovda@mgupp.ru

Тел. +7(499)750-01-11, доб. 7135



Д.А. Куликов



Профессор кафедры Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза, ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ», доктор технических наук, профессор, профессор РАН



Н.Г. Машенцева



Почтовый адрес:

125080, г. Москва, ул. Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: MashencevaNG@mgupp.ru

Тел. +7(499)750-01-11, доб. 6883

Доцент кафедры Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза, ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ», кандидат технических наук

Почтовый адрес:

125080, г. Москва, ул. Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: volnovaer@mgupp.ru

Тел. +7(499)750-01-11, доб. 6075



Е.Р. Вольнова

