

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.287.02, СОЗДАННОГО
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНЖЕНЕРНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета
от 05 сентября 2024 года № 7

О присуждении Бытяк Денису Сергеевичу, гражданину РФ, ученой степени кандидата технических наук.

Диссертация «Разработка биотехнологии рекомбинантной фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii*» по специальности 2.7.1. Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ принята к защите 10 июня 2024 г. (протокол заседания № 6) диссертационным советом 24.2.287.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 394036, Воронеж, проспект Революции, д. 19, приказ о создании диссертационного совета от 22.10.2022 г. №1154/нк (с изменениями от 26.09.2023 г. №1832/нк).

Соискатель Бытяк Денис Сергеевич, 31 октября 1995 года рождения, в 2016 г. окончил Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» «НИУ БелГУ», получив диплом бакалавра; в 2018 г. окончил магистратуру в «НИУ БелГУ». В 2022 г. освоил программу подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет». Работает менеджером по разработке технологий в департаменте биотехнологий ООО «Герофарм».

Диссертация выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор **Корнеева Ольга Сергеевна**, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий».

Официальные оппоненты:

Синицын Аркадий Пантелеймонович – доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией биотехнологии ферментов, кафедры химической энзимологии (химический факультет) Федерального государственного бюджетно-

го образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»;

Гордеева Татьяна Леонидовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет» (ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»), г. Москва, в своем **положительном** отзыве, подписанном Куликовым Дмитрием Александровичем, кандидатом технических наук, доцентом, заведующим кафедрой «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза»; Машенцевой Натальей Геннадьевной, доктором технических наук, профессором, профессором кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза»; Вольновой Екатериной Романовной, кандидатом технических наук, доцентом кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза», указала, что диссертационное исследование выполнено на актуальную тему, связанную с совершенствованием экспрессионных систем на базе *Komagataella phaffii*, с целью разработки эффективной технологии высокоактивной фосфолипазы. 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. Представленная на официальное оппонирование диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по действующему «Положению о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Бытак Денис Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1 Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ. Отзыв заслушан и утвержден на заседании кафедры биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» (протокол №34 от «12» 08 2024 г.).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что они являются признанными специалистами в области биотехнологии ферментных препаратов, что подтверждается наличием соответствующих публикаций в ведущих научных рецензируемых изданиях, а также их многолетним опытом, профессионализмом и компетентностью в научно-исследовательских направлениях, смежных с тематикой диссертации по защищаемой специальности.

Соискатель имеет 11 опубликованных работ по теме диссертации, из них в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК РФ Минобрнауки России опубликовано 5 статей, в том числе 2 статьи из международных баз данных Scopus и Web of Science, а также 2 патента РФ. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах. Все работы опубликованы с соавторами, общий объем публикаций составляет 7,55 усл. п. л., авторский вклад

соискателя составляет 6,8 усл. п. л.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. A. Rozanov. Production of subtilisin proteases in bacteria and yeast / A.S. Rozanov, S.V. Shekhovtsov, N.V. Bogacheva, E.G. Pershina, A.V. Ryapolova, D.S. Bytyak, S.E. Peltek // Vavilov Journal of Genetics and Breeding – 2021. Т: 25 №1, Р. 125 – 134. 2.

2. Filkin S. Expression, purification and biophysical characterization of recombinant *Streptomyces violaceoruber* phospholipase PLA2 overproduced in *Pichia pastoris* / S. Y. Filkin, A. A. Zenin, A. V. Lipkin, A. A. Sichev, D. S. Bytiak // Preparative Biochemistry & Biotechnology. 2020. - Vol. 50. - PP. 549-555.

3. Бытяк Д. С. Разработка стратегии индукции АОХ1 промотора при культивировании метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* / Д. С. Бытяк, О. С. Корнеева, Е. А. Мотина // Вестник ВГУИТ – 2021. Т. 83, № 1, С. 115 – 120.

4. Бытяк Д. С. Сравнительная экспрессия рекомбинантной фосфолипазы А2 в *Komagataella phaffii* в зависимости от модификации сигнального пептида альфа-фактора / Д. С. Бытяк, Ю. А. Гладченко, А. В. Ряполова, О. С. Корнеева, Е. А. Мотина // Вестник ВГУИТ – 2021. Т. 83, № 1, С. 263 – 269.

5. Бытяк Д. С. Практические подходы к биосинтезу рекомбинантных белков / Д. С. Бытяк, Г. В. Хорошилова, А. Б. Гнеушев, П. Г. Сидоров, Д. А. Гусаров // Биофармацевтический журнал – 2022. Т. 14. № 6, С. 44 – 48.

На диссертацию и автореферат поступили 7 отзывов, все отзывы положительные. В отзывах отмечено, что представленная к защите диссертационная работа характеризуется актуальностью, научной новизной, имеет теоретическое и практическое значение, замечания и вопросы носят рекомендательный характер и не снижают высокой ценности выполненной работы.

Отзывы прислали:

1) **Молчанов Владимир Петрович**, доктор технических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет». В качестве замечаний отмечено, что в автореферате диссертации допущены опечатки (например, при расшифровке символов уравнения (4) на странице 12 и при указании ссылок на нормативные документы на странице 17), затрудняющие восприятие и анализ текста. Кроме того, на рисунке 16 было бы целесообразно представить кумулятивную кривую, описывающую потерю активности фосфолипазы А2, поскольку ни одна из точек на имеющейся кривой не выходит за рамки погрешности определения.

2) **Канарский Альберт Владимирович**, доктор технических наук, профессор кафедры пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технический университет». Замечание: следует пояснить по какой причине не использовалась поваренная соль в экспериментах с ферментом *Maхара* (DSM), табл. 2. С.17.

3) **Демиденко Алексей Владимирович**, кандидат биологических наук, руководитель отдела анализа белка ООО «Система-БиоТех» (отзыв без замечаний).

4) **Батлуцкая Ирина Витальевна**, доктор биологических наук, профес-

сор, заведующая кафедрой биотехнологии и микробиологии НИУ «Белгородского государственного университета». В качестве замечаний отмечено, что удельная активность ферментного препарата, по данным автора, выше, чем аналогичный показатель у коммерческих аналогов, что требует более детального пояснения.

5) **Крымский Михаил Александрович**, кандидат биологических наук, директор по науке ЗАО НПК «КОМБИОТЕХ». Замечание: в работе не представлены данные, отражающие влияние времени культивирования на продуктивность целевого белка, что не позволяет в полной мере оценить достаточность времени синтеза и как следствие, потенциала разработанного штамма-продуцента.

6) **Розанов Алексей Сергеевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник направления «Генетика» Научного центра Генетики и Наук о Жизни, АНОО ВО «Университет «Сириус». В отзыве имеются замечания, связанные с недостаточной проработкой подходов к конструированию штамма продуцента.

7) **Цугкиев Борис Георгиевич**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, директор НИИ биотехнологии, заведующий кафедрой биотехнологии и стандартизации ФГБОУ ВО Горский ГАУ (отзыв без замечаний).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан штамм дрожжей *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2, ауксотрофный по лейцину (депонирован в ВКПМ Y-4761); впервые получен штамм-продуцент *Komagataella phaffii* YIB Δ ley2_PLA2Sv обеспечивающий синтез рекомбинантной фосфолипазы A2;

предложено и обосновано с позиции современных представлений о синтезе рекомбинантных белков использование метилотрофного дрожжевого микроорганизма *K. phaffii* в качестве платформы для синтеза фосфолипазы A2;

доказана перспективность и целесообразность использования штамма *Komagataella phaffii* YIB Δ leu2, ауксотрофного по лейцину в качестве реципиента при сборке безмаркерного штамма-продуцента фосфолипазы A2.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана эффективность экспрессии фосфолипазы A2 из *S. violaceoruber*, на основе разработанного нового безмаркерного рекомбинантного штамма *K. phaffii* YIB Δ ley2_PLA2Sv;

применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов) использован комплекс существующих молекулярно-генетических, микробиологических и биохимических методов исследования, позволяющий получать высокоактивную фосфолипазу A2 путем микробиологического синтеза;

изложены аргументы и доказательства целесообразности и перспективности применения молекулярно-генетических технологий с целью получения высокопродуктивных штаммов-продуцентов фосфолипазы A2;

раскрыты проблемы получения высокопродуктивной микробной фосфолипазы A2 с применением системы тангенциальной ультрафильтрации;

изучены оптимальные параметры культивирования *K. phaffii* YI-

ВΔley2_PLA2Sv и физико-химические характеристики полученной фосфолипазы A2;

проведена модификация состава питательной среды и условий культивирования штамма-продуцента, в том числе стратегии индукции AOX1 промотора, обеспечивающего эффективный биосинтез фосфолипазы A2.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены:

– способ получения ферментного препарата фосфолипазы A2 с применением рекомбинантного штамма-продуцента *Pichia pastoris* X-33/ pPICZαA-PhoA2-StV (патент РФ № 2676321) апробирован и внедрен на производственной площадке ГК «ЭФКО».

– способ получения штамма-продуцента фосфолипазы A2 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) YIB Δley2_PLA2Sv (патент РФ № 2746817);

определены перспективы практического применения разработанного ферментного препарата фосфолипазы A2 для модификации яичного желтка при производстве майонезной продукции;

разработана технологическая схема производства высокоактивной фосфолипазы A2;

представлены технические решения процесса ферментации яичного желтка полученным ферментным препаратом фосфолипазы A2; наработана опытная партия пищевой продукции в количестве 25 кг, соответствующая требованиям ГОСТ 30363-2013, ГОСТ 32149-2013, ГОСТ 10444.11-2013, ГОСТ 1044.12-2013.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

воспроизводимость результатов исследования в различных условиях эксперимента. Экспериментальные данные получены на сертифицированном современном оборудовании, подвергнуты статистической обработке; **теория** построена на известных проверяемых данных по получению рекомбинантных ферментов и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации; **идея базируется** на анализе теоретически обоснованных положений отечественных и зарубежных исследователей по тематике диссертации; **использованы** сравнения авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике; **установлено** качественное и количественное совпадение результатов, полученных автором экспериментально, с результатами моделирования эксперимента; **использованы** современные методики сбора и обработки исходной информации, обеспечивающие выбор объектов исследований, постановку цели и формулировку задач работы.

Личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии на всех этапах выполнения научно-исследовательской работы; в формулировании основной научной гипотезы, цели и задач исследования; в анализе и интерпретации полученных данных, подготовке научных публикаций; апробации результатов исследования; проведении опытно-промышленной апробации результатов предлагаемых технологических решений.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические

замечания:

1. На электрофореграмме (слайд № 12) отсутствует результат электрофореза препарата до индукции.
2. Как объясняется гиперэкспрессия трех белков при том, что целевой фермент соответствует молекулярной массе 14 кДа?
3. В заключении указано, что получена опытная партия пищевой продукции, соответствующая требованиям ГОСТ. Уточните какой именно пищевой продукции и какой именно ГОСТ?
4. Какому часу культивирования соответствуют данные, представленные на слайде № 14?
5. На слайде № 14 показано, что к 24 часу культивирования уровень продуктивности белка составляет более 2,3 г/л. Почему в выводе № 4 в качестве наилучшего результата указана продуктивность 1,87 г/л к 96 часу культивирования?
6. Имеются ли данные по кинетике накопления целевого белка и целевой ферментативной активности в процессе культивирования?
7. Исследовалось соотношение растворимой и нерастворимой долей целевого белка при увеличении длительности культивирования рекомбинантного штамма?
8. Чем объясняется повышение удельной активности фосфолипазы A2 в процессе концентрирования (слайд 23)?
9. Какими методами проводилось исследование активности фосфолипазы A2?
10. Почему выбран природный ген фосфолипазы A2 *Streptomyces violaceoruber*, а не мутантный?
11. Аргументируйте выбор именно керамических фильтрационных систем указанных производителей с заданной селективностью для исследования?
12. Почему в качестве решения выбраны фильтрационные системы Tami (10 кДа), при том, что производительность Atech (5 кДа) в 10 раз больше?
13. Чем объясняется, что Tami 10 кДа имеет меньшую фильтрующую способность, чем Tami 8 кДа?

Соискатель Бытак Д.С. согласился с замечаниями и ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы, привел собственную аргументацию:

1. Результат электрофоретического анализа культуральной жидкости не представлен в работе в связи с тем, что с момента начала культивирования до индукции рАОХ1 недостаточно времени для эффективной экспрессии целевого белка в культуральную жидкость.
2. Гиперэкспрессия трех белковых форм в области 14 кДа объясняется гликозилированием целевого белка в процессе синтеза и не приводит к снижению удельной ферментативной активности.
3. В ходе работы получен ферментированный яичных желток, соответствующий требованиям ГОСТ 30363-2013, ГОСТ 32149-2013, ГОСТ 10444.11-2013 и ГОСТ 1044.12-2013.
4. Данные, представленные на слайде № 14, демонстрируют результаты

культивирования штамма-продуцента в колбах в течение 22-24 часов.

5. Продуктивность 2,3 г/л в колбах отражает содержание общего белка, определяемого по Бредфорду, в то время как продуктивность 1,87 г/л, указанная в выводах, демонстрирует продуктивность фосфолипазы A2.

6. Данные по кинетике накопления целевого белка и целевой ферментативной активности в процессе культивирования представлены в ранее опубликованных статьях.

7. Исследование соотношения растворимой и нерастворимой долей целевого белка при увеличении длительности культивирования рекомбинантного штамма не проводилось, в исследовании ограничились определением ферментативной активности, которой обладает только растворимая фракция.

8. Повышение удельной активности фосфолипазы A2 в процессе концентрирования объясняется предварительным удалением высокомолекулярных примесей при фильтрации через фильтрационные системы (150-300 кДа), частичной сменой буферной среды и снижением концентрации ингибирующих агентов.

9. Исследование активности фосфолипазы A2 проводилось потенциометрическим методом, основанном на титровании жирных кислот при гидролизе молекул лецитина. Сравнение различных методов определения активности фосфолипазы A2 не проводилось, т.к. применяемый метод обладает высокой точностью и скоростью выполнения анализа.

10. Согласно литературным данным природный ген фосфолипазы A2 *Streptomyces violaceoruber* кодирует фосфолипазу A2, обладающую необходимыми физико-химическими характеристиками, чем и обусловлен его выбор.

11. Выбор керамических фильтрационных систем обусловлен их высокой эффективностью из-за низкой сорбционной способности и высокой химической стойкости.

12. Несмотря на низкую фильтрующую способность, фильтрационные системы Tamі 10 кДа обеспечивают минимальные потери целевого белка, что является наиболее значимым с экономической точки зрения.

13. В виду конструктивных различий (количество каналов, их диаметра и толщины), фильтр Tamі 10 кДа имеет меньшую фильтрующую способность, чем 8 кДа.

На заседании 05 сентября 2024 г. диссертационный совет за новые научно обоснованные технические и технологические решения по разработке биотехнологии высокоактивной отечественной фосфолипазы A2, имеющей существенное значение для пищевой биотехнологии, принял решение присудить Бытяк Денису Сергеевичу ученую степень кандидата технических наук по специальности 2.7.1. Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 13 человек, из них 4 доктора наук по специальности 2.7.1. Биотехнологии пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ, участвовавших в заседании, из 15 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» – 13, «против» – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председательствующий,
заместитель председателя совета по
защите диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук, на
соискание ученой степени доктора наук
24.2.287.02, д.х.н., проф.



Суханов Павел
Тихонович

Ученый секретарь совета по защите
диссертаций на соискание ученой
степени кандидата наук, на соискание
ученой степени доктора наук
24.2.287.02, к.т.н.

Мещерякова Ольга
Леонидовна

Заключение подписано 05.09.2024 г.