

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Филькина Сергея Юрьевича
«Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы А2 и химозина в
метилотрофных дрожжах *P. pastoris*», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Диссертационная работа Филькина С.Ю. посвящена актуальной проблеме: исследованию биохимических процессов, проходящих в клетках метилотрофных дрожжей при экспрессии рекомбинантных ферментов фосфолипазы А2 и химозина. Исследование биохимических и физико-химических свойств рекомбинантной ФЛА2 и химозина имеет большое прикладное значение. Оба фермента, и фосфолипаза А2 (ФЛА2) из *Streptomyces violaceoruber* и химозин *Bos taurus*, являются важными промышленными ферментами, которые активно используются в пищевом производстве.

Актуальность темы диссертации.

Ферменты представляют собой важную группу критически значимых продуктов биотехнологии, без которых не возможно современное производство продуктов питания. К сожалению, в Российской Федерации в основном используются импортные ферментные препараты, что приводит к технологической зависимости. Это касается и ферментов фосфолипазы А2 и химозина – объектов данной диссертационной работы. Вместе с тем, фосфолипазы А2 (ФЛА2) является важным промышленным ферментом, необходимым для эмульгирования яичного желтка, что важно при производстве майонеза, соусов и хлебобулочных изделий, а также при очистке, дегуммирования растительных масел. Учитывая, что Российская Федерация в этом году стала крупнейшим в мире экспортером растительных масел и продуктов на их основе, очевидно, что потребность в отечественном производстве фосфолипазы А2 будет только возрастать.

В свою очередь, химозин является ключевым ферментом для производства сыра из створоженного молока. В качестве натурального источника химозина используются желудки телят. Альтернативой натуральному химозину является рекомбинантный химозин, производимый генетически измененными микроорганизмами. На российском рынке химозина также доминируют иностранные компании.

Таким образом, сохраняется актуальность работ по поиску новых вариантов ферментов фосфолипазы A2 и химозина с уникальными каталитическими свойствами, отработке технологий выделения и очистки ферментов, созданию штаммов-продуцентов рекомбинантных ферментов, т.е. как раз тех работ, которые выполнялись в рассматриваемой диссертационной работе.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной. В ней реализованы уникальные подходы и большой опыт в изучении ферментов, накопленный в ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. В рамках диссертационной работы получены следующие новые научные результаты:

1. Из яда кобры *Naja haje* выделен и охарактеризован структурный гомолог фосфолипазы A2 - ФЛА2 TI-Nh, обладающий антикоагулянтной активностью и способный ингибировать фибринолитическую и амидолитическую активность тромбина. Этот белок – первый обнаруженный ингибитор тромбина, выделенный из яда змей семейства *Elapidae* и первая описанная ФЛА2, способная ингибировать тромбин.
2. Получен штамм-продуцент рекомбинантного химозина быка в *P. pastoris* с системой интеграции гена в хромосому дрожжей. Хотя уровень продукции (около 100 мг/л) пока не достаточен для промышленного производства, достигнутый уровень создает основу для работы над промышленным штаммом.
3. Показано увеличение на 50% продукции химозина при коэкспрессии в клетках *P. pastoris* транскрипционного фактора sHAC1 (стимулирует процессы экспорта и созревания целевых белков в рекомбинантных штаммах) и гена химозина быка под P_{AOX1} - промотором. Метаболомный анализ показал заметное увеличение пула НАДН/НАД⁺, т.е. увеличение восстановительного потенциала НАДН/НАД⁺, используемого в биосинтетических процессах.
4. Разработаны методы выделения и очистки рекомбинантных ФЛА2 и химозина быка, продуцируемых *P. pastoris*. Полученные ферментные препараты не содержат хозяйской ДНК и является пригодным для использования в промышленных целях.

Достоверность результатов диссертационной работы Филькина С.Ю. обусловлена использованием современных биологических, биохимических и физико-химических методов, значительным объемом экспериментальных данных.

Положения, выносимые на защиту, аргументированы, выводы подтверждены экспериментальными данными и научно обоснованы, при этом соответствуют содержанию работы.

Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.

Автором получены интересные результаты о новых вариантах промышленно-значимых ферментов – фосфолипазы А2 и химозина, выделенных из альтернативных природных источников. Хотя эти варианты не могут непосредственно использоваться в пищевой промышленности, однако знания о каталитических свойствах новых вариантов ферментов чрезвычайно полезны для изучения структурно-функциональных взаимосвязей в белках и, на этой основе, получения мутантных форм фермента с улучшенными характеристиками.

В практическом плане представляют значительный интерес созданные автором штаммы-продуценты и разработанные методики очистки ферментов фосфолипазы А2 из *Streptomyces violaceoruber*, и химозина из *Bos taurus*, продуцируемых дрожжами *P. pastoris*. Это еще один шаг к созданию отечественной технологии производства ферментов для пищевой промышленности.

Содержание диссертации.

Диссертационная работа Филькина С.Ю. построена по традиционному плану, изложена на 121 странице, состоит из введения, обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы исследований, результаты, а также выводов и списка литературы, включающего 187 источников. Диссертация в достаточной мере иллюстрирована, содержит 36 рисунков и 13 таблиц.

Цели, задачи, актуальность, научно-практическая значимость проводимого исследования описаны во введении к диссертационной работе. Обзор литературы состоит из трех разделов. Первый раздел детально описывает устройство экспрессионной системы *P. pastoris*. Второй раздел посвящен исследованию биохимических свойств фосфолипаз А2, их текущему применению в различных отраслях народного хозяйства. Третий раздел посвящен исследованию биохимических свойств химозина быка и других молоко-свертывающих ферментов. Обзор литературы свидетельствует, что диссертант прекрасно ориентируется в предмете изучения и способен на основе анализа литературы сформулировать цели и новые задачи по изучению ферментов.

Раздел «**Материалы и методы исследования**» посвящен биохимическим методам, которые были использованы для выделения и очистки полученных ферментов, определения их ферментативной активности. Также достаточно большое внимание уделено молекулярно-биологическим методам, использованным для получения генетических конструкторов, векторов и селекции штамм-продуцентов. Так же уделено внимание использованным методам моделирования, пробоподготовки для масс-спектрометрического анализа метаболома.

Диссертант в полном объеме представил описание материалов и методов, применяемых в диссертационной работе, что позволит использовать разработанные подходы другими исследовательскими коллективами очень детально. Для решения каждой задачи были использованы оптимальные методы исследования.

Раздел «**Результаты и обсуждение**» содержит результаты экспериментальной работы по исследованию двух ферментов - фосфолипазы A2 и химозина, которые широко используются в пищевой промышленности. Работы по каждому из этих ферментов преследовали две задачи: разработать отечественную технологию получения рекомбинантного фермента на основе и хорошо зарекомендовавшей себя системы экспрессии в *P. pastoris*, а также создать задел на будущее. В первом случае - использованы известные варианты ферментов - фосфолипаза A2 (ФЛА2) из *Streptomyces violaceoruber* и химозин *Bos taurus*. Упор в этом случае делался на конструирование штаммов-продуцентов и на разработку методов выделения и очистки с использованием разнообразных хроматографических систем. Применение экспрессионной системы *P. pastoris* (*K. phaffii*) позволило диссертанту получить высокие выходы при биотехнологическом синтезе рекомбинантных ферментов (секреторной ФЛА2 и химозина), а также разработать относительно несложные масштабируемые методы очистки. Учитывая, что эти ферменты уже производятся за рубежом, можно рассматривать эту часть работы как импортозамещение или как обеспечение технологического суверенитета. Но в таком случае важно представить сравнение с существующим мировым уровнем для того, чтобы понять место собственных результатов. Однако такой анализ в диссертационной работе отсутствует, что не позволяет в должной мере оценить полученные результаты и их соответствие мировому уровню.

В рамках второй задачи проводился поиск новых вариантов ферментов, исследования которых могли бы создать опережающий задел в этой области. Автор использовал два уникальных источника для поиска новых ферментов: яд кобры *Naja haje* для поиска фосфолипаз и зубатого кита белуху как источника химозина.

Поиски новых ферментов из яда кобры дали интересный и неожиданный результат. Обнаружен уникальный фермент, который принадлежал к классу фосфолипаз ФЛА2 (методами масс-спектрометрии, ДСН гель-электрофореза, а также по наличию 7 дисульфидных мостиков и по анализу N-концевой последовательности), но при этом он обладал антикоагулянтной активностью и являлся ингибитором тромбина. Это первая описанная ФЛА2, способная ингибировать тромбин. При этом следует отметить, что доказательств того, что ФЛА2 TI-Nh обладает также фосфолипазной активностью пока представлено недостаточно, все они носят косвенный характер. Здесь бы могли пригодиться генетические методы для доказательств наличия фосфолипазной активности, в т.ч.: клонирование и экспрессия в организмах, не обладающих фосфолипазной активностью. Это можно рассматривать как пожелание на будущее.

Изучение биохимических и каталитических свойств нового представителя семейства белков фосфолипазы A2, выделенного из яда кобры, позволило расширить наши представления о спектре потенциальных функциональных активностей у структурно сходных белков, выделенных из эволюционно удаленных групп животных, таких как млекопитающие и рептилии (змеи). Хотя у нового фермента нет перспектив для применения в пищевой промышленности, однако полученные знания важны для создания ферментов с улучшенными свойствами.

Похожая ситуация произошла и с химозином белухи. Диссертантом были сконструированы штаммы *P. pastoris*, продуцирующие химозин, оптимизированы условия. Оптимизирована методика выделения и очистки, изучены свойства ферментов. Однако оказалась, что этот фермент не может использоваться в пищевой промышленности. Химизин белухи обладал довольно низкой молоко-свертывающей активностью и высокой протеолитической активностью, что препятствует использованию для получения сыра. Анализ структуры химизина белухи позволил предположить, что аминокислотные замены K221M и K295Q ведут к ухудшению связывания казеиновых мицелл с химозином. Эта информация особенно значима при создании новых вариантов ферментов с помощью рационального дизайна.

Таким образом, изучение ферментов, выделенных из уникальных природных источников позволяют получать новые знания о структурно-функциональных взаимоотношениях для формирования базы знаний и применения методов искусственного интеллекта для генерации новых ферментов с уникальными свойствами.

В заключении хотелось обратить внимание на очень интересный и важный раздел работы, связанный с выявлением лимитирующих стадий биосинтеза рекомбинантных белков методами метаболомики. Известно, что продукция рекомбинантных белков является большой нагрузкой на метаболизм в целом, в том числе на биосинтетический аппарат метилотрофных дрожжей. Понимание закономерностей изменения метаболома в системе *P. pastoris* при экспрессии целевых рекомбинантных белков может помочь в увеличении продуктивности штамм-продуцентов.

Хотя метаболомный анализ не выявил значимого недостатка отдельных аминокислот в клетках *P. pastoris* при экспрессии рекомбинантного химозина, что, по-видимому, связано с низкой продуктивностью исследуемого штамма (около 100 мг/мл), этот подход обладает большим потенциалом в случае сверхсинтеза.

Серьезным недостатком экспериментальной части работы является очень скудное обсуждение полученных результатов, что бесспорно является важной частью диссертационной работы.

Опубликование результатов диссертации в научной печати.

Результаты диссертационной работы Филькина С.Ю. в полном объеме представлены в печатных работах - 8 статьях, опубликованных в российских и зарубежных научных журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ. Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях, что нашло отражение в 6 тезисах докладов. Практические результаты работы защищены 4 патентами Российской Федерации.

Содержание автореферата.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Заключение

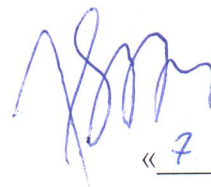
Диссертационная работа Филькина Сергея Юрьевича «Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*» является законченной квалификационной научной работой, которая по актуальности проведенных экспериментов, уровню решения поставленных задач, новизне, научной и практической значимости полученных результатов соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по п. 9 «Положения о присуждении ученых

степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции), а ее автор, Филькин Сергей Юрьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Заместитель руководителя Курчатовского комплекса
НБИКС-природоподобных технологий по научной работе
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»»
(НИЦ «Курчатовский институт»),
доктор биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (03.02.07 – генетика),
1.5.11. Микробиология (03.02.03 — микробиология (биологические науки)), профессор

Яненко Александр Степанович



А.С. Яненко

« 7 » ноября 2025 г.

Контактные данные:

Телефон: +7 (499) 196-90-53

Адрес электронной почты: yanenko_AS@nrcki.ru

Адрес места работы: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д.1,

тел. +7 (499) 196-90-53, e-mail: yanenko_AS@nrcki.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»» (НИЦ «Курчатовский институт») Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий.

Подпись д.б.н., проф. Яненко А.С. заверяю
Первый заместитель главного ученого секретаря –
руководитель службы главного ученого секретаря
НИЦ «Курчатовский институт»
кандидат физико-математических наук



К.Е. Борисов

« 7 » ноября 2025 г.