

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.

Актуальность темы

Запросы пищевой промышленности на разработку белковых препаратов, обеспечивающих удешевление, масштабирование и экологичность технологических процессов, вызывают необходимость создания штаммов – продуцентов ряда ферментов. В работе Филькина С.Ю. изучались ферменты фосфолипаза А2 и химозин, их ферментативная активность, а также разработаны подходы к экспрессии рекомбинантных ферментов фосфолипазы А2 (ФЛА2), химозина, позволяющие увеличить продуктивность экспрессионных штаммов-продуцентов *Pichia pastoris* которые являются непатогенными, облигатно аэробными, почкующимися дрожжами. В работе широко используются различные биохимические методы, в том числе хроматографические, как для аналитического выделения и характеристики исследуемых белков, так и для разработки методов очистки индустриальных ферментов, необходимых для пищевой промышленности. В связи с этим работа является актуальной, как для фундаментальной науки, так и в практическом отношении.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Полученные в диссертационной работе результаты и сформулированные выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Достоверность полученных результатов определяется применением современных молекулярно-генетических методов исследования и не вызывает сомнения. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 6 российских и международных конференциях. Список работ включает 8 работ, все из которых изданы в российских и международных журналах. В рамках темы диссертации выполнены 4 научно-исследовательские разработки, результаты которых оформлены патентами.

Научная новизна

Разработаны подходы для масштабируемых процессов выделения и очистки рекомбинантных ФЛА2 и химозина. Впервые проведена характеристика и описание нового

белка из группы секретируемых ФЛА2, выделенного из ядов змей, с установленными антикоагулянтными свойствами. Также охарактеризован и описан рекомбинантный химозин белухи, выявлены структурные детерминанты, отличающие его от химозина быка и других ферментов, свертывающих молоко. Исследованы варианты использования различных генетических конструкций для экспрессии рекомбинантного химозина с максимальной продуктивностью. В работе также исследованы изменения метаболомного состава при продукции рекомбинантных ферментов в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*. Актуальность темы диссертации, а также существующие эмпирические подходы, направленные на оптимизацию условий синтеза гибридных белков в клетках *P. pastoris*, хорошо продемонстрированы в обзоре литературы. На защиту вынесены положения и результаты экспериментов, где роль автора была определяющей.

Научно-практическая значимость работы

Описанные в данной работе методы получения очищенных ферментов фосфолипазы A2 и химозина из культуральной жидкости *P. pastoris* могут найти прямое применение в пищевой промышленности. Разработанные подходы по оптимизации продукции рекомбинантных белков интересны с научной точки зрения и имеют важное практическое значение. Исследование и оценка энергетического и метаболического состояния клетки *P. pastoris* являются существенными для оптимизации процессов получения биотехнологически важных препаратов.

Структура диссертационной работы

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: «Общая характеристика работы», «Обзор литературы», Глава «Материалы и методы исследования», Глава «Результаты и обсуждение», «Заключение», в котором сформулированы выводы, «Список литературы» и «Приложения», включающие карты генетических конструкций, используемых в работе и дополнительные данные метаболомных экспериментов. Диссертация изложена на 121 странице, иллюстративный материал составляет 13 таблиц и 44 рисунков. Библиография включает 187 источников 10% которых. относятся к периоду 2020-2025 годов.

В разделе «**Введение**» точно сформулирована цель работы и в соответствии с ней поставлены задачи исследования.

«**Обзор литературы**» состоит из трех основных разделов, В «Обзоре литературы» достаточно подробно описаны современные представления как экспрессионной системы, регуляции основных используемых промоторов, секреторной системы *P. pastoris*, так и

исследуемые ферменты фосфолипазу A2 и химозин. «Обзор литературы» имеет четкую структуру и раскрывает основные направления на улучшении активности и изучения экспрессии рекомбинантных ферментов. Обзор написан с использованием большого количества литературы, включая самые последние на сегодняшний день данные в этой области, и не вызывает никаких возражений.

В «Материалах и методах исследования» автором аккуратно и подробно описаны использованные в работе реактивы и реагенты, а также все необходимые молекулярно-биологические методы получения штамм-продуцентов, биохимические методы для их характеристики и анализа, методы пробоподготовки и анализа метаболома *P. pastoris*. Широкий спектр используемых методов исследований описаны подробно на 20 страницах, отражают высокий экспериментальный уровень исследований и их адекватность поставленным задачам. В исследованиях применялись новые подходы. Методики, использованные при выполнении диссертации, содержат все необходимые сведения, которые могут быть полезными для исследователей, желающих использовать их в своих работах.

«Результаты и обсуждение» наглядно проиллюстрированы, что позволяет сделать заключение о достоверности полученных данных. Экспериментальная часть диссертационной работы описывает шесть последовательных этапов или разделов выполнение которых позволило диссертанту сделать вполне обоснованные выводы. Первый раздел описывает очистку и характеристику фосфолипазы A2 TI-Nh из яда египетской кобры *N. haje*, которая обладает антикоагулянтными свойствами. Следующие две части диссертационной работы сфокусированы на описании экспрессии, выделения и очистки рекомбинантной фосфолипазы A2 из *Streptomyces violaceoruber*, её физико-химических свойств и термостабильности рекомбинантного белка в различных условиях. Четвёртый раздел посвящен подбору условий для оптимальной продукции рекомбинантного химозина быка в экспрессионной системе *P. pastoris*. Пятый раздел включает описание, получение и характеристику рекомбинантного химозина белухи. Следующая часть работы посвящена не менее важной проблеме - анализу метаболома у исследуемых штамм-продуцентов химозина быка и анализу изменений метаболом при коэкспрессии сплайс-варианта транскрипционного фактора HAC1. Все полученные результаты являются новыми. Основным достижением данной работы считаю разработку общих подходов для получения ферментативных препаратов пригодных для использования в промышленных целях, четко описаны технологические разработки для решения поставленных задач.

Диссертационная работа завершается «**Заключением**» и «**Выводами**». Выводы диссертации сформулированы четко и логически вытекают из результатов проведенного исследования.

Степень достоверности полученных результатов

Научные положения, выносимые на защиту, полностью отражают основные результаты диссертационного исследования и соответствуют поставленным задачам, согласуются с приведенными в таблицах и рисунках экспериментальными данными. Выводы, сделанные С. Ю. Филькиным на основе экспериментальной работы вполне обоснованы, и являются актуальными для таких отраслей науки как молекулярная биология, молекулярная генетика, биохимия, общая и производственная биотехнологии. Диссертационная работа Филькина С. Ю. является законченным научным исследованием. Полученные данные опубликованы в ведущих отечественных реферируемых журналах и докладывались на научных конференциях. Научные положения, выносимые на защиту, полностью отражают основные результаты диссертационного исследования. С результатами работы следует ознакомить Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), Научно-исследовательский институт гриппа СО РАМН (Санкт-Петербург), ГНЦ вирусологии и биотехнологии ВЕКТОР (Новосибирск), Химический и Биологический факультеты МГУ им М. В. Ломоносова, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Москва), Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург), Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Пушино), Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва), Московскую ветеринарную академию им К.Г. Скрыбина (Москва) и многие другие биотехнологические фирмы в России и зарубежом, которые занимаются развитием промышленной биотехнологии.

Говоря о стиле написания всей работы: она написана четким, лаконичным языком, хотя не лишена "жаргонных" (лабораторных) выражений, в отдельных местах не выправлены опечатки. Это в некоторых случаях затрудняет чтение работы, но не умаляет ее значение. Диссертация хорошо документирована и иллюстрирована как рисунками, так и таблицами. Текст автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертации. В нем показан вклад автора в проведенное исследование, а также степень новизны, теоретическая и практическая значимость результатов исследований.

Диссертационная работа Филькина Сергея Юрьевича на тему «Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в метилотрофных дрожжах *P.*

pastoris» является завершенным научным исследованием, которое по актуальности проведенных экспериментов, уровню решения поставленных задач, новизне, научной и практической значимости полученных результатов соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по пп. 9-11, 13, 14 «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:

Заведующий лабораторией молекулярной микробиологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук» доктор биологических наук по специальности

03.01.03 – «молекулярная биология», доцент

Солонин Александр Сергеевич



« 18 » октября 2025 г.

Контактные данные:

Телефон: +79263013903

Адрес электронной почты: solonin.a.s@yandex.ru

Адрес места работы: 142290 г. Пушкино, Проспект науки, д. 3.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук».

Подпись д.б.н. Солонина А.С. заверяю

Ученый секретарь «Федерального исследовательского центра «Пушкинского научного центра биологических исследований» Российской академии наук»



Г.Н. Назарова

« 18 » октября 2025 г.