



ООО «СибЭнзайм»

630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12
E-mail: info@sibenzyme.ru
<http://www.sibenzyme.ru>

Тел.: (383) 333-49-91
Тел/Факс: (383) 333-68-53

ОТЗЫВ

официального оппонента Гончара Д.А. на диссертационную работу Беленькой Светланы Валерьевны «Свойства рекомбинантного химозина алтайского марала *Cervus canadensis sibiricus*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Диссертационная работа Беленькой С.В. посвящена клонированию гена химозина алтайского марала (*Cervus elaphus sibiricus*) в составе экспрессионных векторов *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis* и изучению биохимических свойств полученных рекомбинантных ферментов. Широкий спектр функций, выполняемых аспарагиновыми протеазами (АП), в том числе химозином, в живой природе, является причиной их интенсивного использования в различных отраслях хозяйственной деятельности. Химозин активно применяется в качестве добавки при ферментации и производстве различных пищевых продуктов. Детальное изучение механизмов работы АП позволило разработать и внедрить целую группу фармпрепаратов. Получение новых данных о генетической организации ферментов группы химозинов, их аминокислотных последовательностях, вторичной и третичной структуре, биохимических свойствах, расширит имеющиеся знания в этой области. Поэтому представленная работа решает важные исследовательские и практические задачи, и, несомненно, является актуальной и своевременной.

Диссертационная работа написана в традиционной форме. Она изложена на 115 страницах, содержит 22 рисунка, 11 таблиц и список литературы, включающий 130 ссылок. Диссертация состоит из семи разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Библиографический список».

Во «Введении» автор кратко излагает состояние вопроса в области изучения аспарагиновых протеаз в целом и химозинов, в частности, обосновывает теоретическую и практическую значимость работы по выбранной теме, формулирует цель работы и те задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели.

Глава «**Обзор литературы**», состоящая из двух больших разделов, посвящена всестороннему описанию накопленных к настоящему времени данных о проблемах классификации протеаз, их структурной организации, механизмах активации и катализа, а также об их специфичности по отношению к различным субстратам. При этом отмечается, что ряд вопросов, касающихся узнавания субстрата аспарагиновыми протеазами и специфичности гидролиза, остаются неразрешенными. Помимо этого, в разделе перечисляются функции и особенности структуры химозинов, выделенных из разных видов животных, указываются факторы, влияющие на специфичность ферментов, описываются биохимические свойства этой группы протеаз. Упоминается многолетняя практика использования химозинов для изготовления сыра, что обуславливает не только научную составляющую представленной работы, но и создает предпосылки для практического применения полученных результатов в пищевой промышленности.

Необходимо отметить, что текст обзора написан достаточно хорошим литературным языком, отличается высоким качеством изложения материала, проиллюстрирован тринадцатью рисунками и четырьмя таблицами. Обращает на себя внимание не только широкая эрудиция диссертанта в рассматриваемых вопросах, но и способность Беленькой С.В. всесторонне и критически анализировать имеющиеся литературные источники.

В главе «**Материалы и методы**» приводится детальное описание основных молекулярно-биологических, генно-инженерных и биохимических методов, использованных диссертантом в работе.

Результаты и их обсуждение приведены в 4-ой главе диссертации. Здесь можно выделить четыре логически связанных между собой крупных блока исследований.

В результате выполнения первого блока исследований диссертантом установлена нуклеотидная последовательность, и определена экзон/интронная организация гена, кодирующего прохимозин алтайского марала. Было показано, что длина гена составляет 11161 п.н., и он включает 9 экзонов и 10 интронов. Полученная последовательность была депонирована в базе данных GenBank. На основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *CYM* марала и генов ближайших гомологов была построена филогенетическая дендрограмма, которая продемонстрировала, что вновь выявленная последовательность значительно отличается, как от аналогичных генов семейства полорогих, так и от верблюдовых, формируя совместно с последовательностью белохвостого оленя отдельную группу.

При выполнении второго блока исследований с помощью генно-инженерных методов был получен рекомбинантный штамм *E.coli*, несущий плазмиду pET21a-Cer,

содержащую оптимизированный вариант гена прохимозина алтайского марала в составе экспрессионного вектора. В результате выполнения данного блока исследований получен препарат фермента, обладающий молокосвертывающей активностью, на основании чего сделан вывод, что использование системы *E.coli* позволяет получить функционально активный химозин марала.

В результате выполнения третьего блока исследований диссертантом был создан экспрессионный вектор, обеспечивающий синтез и секрецию целевых белков в дрожжах *Kluyveromyces lactis*. С использованием данного вектора был получен штамм-продуцент прохимозина алтайского марала, который обеспечивал синтез, секрецию и накопление в культуральной среде целевого белка с удельной молокосвертывающей активностью 71719 ± 90 УЕ/мг. Таким образом, получен рекомбинантный аналог химозина алтайского марала, обладающий характеристиками, которые могут быть востребованы производителями сыров.

Четвёртый блок исследований описывает результаты анализа основных биохимических свойств полученных в системах *E.coli* и *K.lactis* рекомбинантных химозинов. В ходе работы были определены такие показатели, как молокосвертывающая активность, общая протеолитическая активность, параметры кинетики Михаэлиса-Ментен, термостабильность, зависимость продолжительности коагуляции молока от значения pH и концентрации хлорида кальция. В обсуждении приводится сравнительный анализ биохимических характеристик полученных химозинов алтайского марала с ранее изученными химозинами коровы и верблюда. Основываясь на результатах проведенного анализа свойств рекомбинантного химозина из *K.lactis*, обсуждается возможность его применения в практическом сыроделии.

В итоговой части диссертации, разделе «**Заключение**», ещё раз подчёркиваются основные моменты диссертации, их научное и практическое значение, в том числе делается обоснованное предположение, что полученные варианты рекомбинантного химозина могут быть использованы при производстве сыров.

Необходимо отметить, что полученные диссертантом новые данные о генетической организации химозина марала, его аминокислотной последовательности и биохимических характеристиках расширят имеющиеся знания, касающиеся связей особенностей структуры ферментов данного типа с их свойствами.

В результате выполнения данной работы впервые определена полная нуклеотидная последовательность гена химозина алтайского марала, установлена его экзон/интронная организация и реконструирована последовательность мРНК участка, кодирующего препрохимозин. Автором самостоятельно сконструированы плазмиды на

основе экспрессионных векторов, обеспечивающие синтез рекомбинантного фермента в системах *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis*. Получены рекомбинантные штаммы-продуценты прохимозина алтайского марала, и выделены целевые ферменты. Для представителей химозинов семейства Оленевых впервые проведен анализ основных биохимических и технологических свойств. Научная ценность и актуальность работы подтверждается девятью публикациями в научных отечественных и зарубежных изданиях, в том числе пятью – в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций. Представлено четыре тезиса докладов на всероссийских и международных конференциях, получено три патента РФ.

Можно без преувеличения сказать, что Светланой Валерьевной проделана значительная и достаточно сложная в методическом исполнении работа. Исследования выполнены с применением современных методов молекулярной биологии, генетической инженерии и биохимии. Диссертационная работа в целом представляет собой законченное научное исследование. Достоверность представленных в диссертации результатов не вызывает сомнений. Выводы, сформулированные в диссертации, адекватны полученным результатам. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

В то же время, к представленной работе можно сделать ряд замечаний:

1. В тексте диссертации встречаются ошибки. Так, например, на странице 20, на рисунке 1.2 аминокислотные остатки обозначены аббревиатурой «а.к.», тогда как во всех других местах используется аббревиатура «а.о.»; два различных рисунка на страницах 35 и 44 имеют одинаковый номер – 1.9; на странице 62 написано ЕДТА вместо ЭДТА.

2. В разделе «Результаты и обсуждение», на мой взгляд, не хватает рисунка с электрофореграммой в ПААГ конечного препарата рекомбинантного химозина, полученного в системе *K.lactis*. И вообще, имело бы смысл в качестве итоговой фразы, описывающей результат получения препаратов рекомбинантного химозина, и в системе *E.coli*, и в системе *K.lactis*, добавить такое предложение, как: в результате выделения и очистки из такого-то количества граммов биомассы (или литров культуральной жидкости) было получено такое-то количество фермента с такой-то концентрацией, такой-то чистоты. Тем более, что степень чистоты (или гомогенности) препарата фермента является очень важным фактором при определении кинетических параметров.

3. В разделе «Заключение» автор суммирует данные, говорящие об отличиях характеристик рекомбинантных химозинов марала, полученных в системах *E.coli* и *K.lactis*, от характеристик эталонных ферментов, например, химозина коровы. В связи с этим, по моему мнению, следовало бы дать какие-то пояснения или рекомендации о том, в

каких случаях при производстве сыра будет наиболее эффективным использование одного или другого фермента, тем более, что они сильно различаются между собой и по кинетическим характеристикам, и по термостабильности. Кроме того, в этом разделе можно было обсудить дальнейшее развитие представленной работы. Например, может стоило бы попытаться встроить ген прохимозина в другой экспрессионный вектор *E.coli*, чтобы получить штамм-продуцент, дающий больший выход целевого белка.

4. В разделе «Выводы» формулировка вывода №4 выглядит слишком общей и несколько расплывчатой. На мой взгляд, в него можно было добавить конкретные числовые значения. То же касается и последнего предложения в выводе №5. Его следовало бы конкретизировать.

Тем не менее, отмеченные недостатки не влияют на общее очень хорошее впечатление от работы и не снижают её значимости как самостоятельного исследования.

Всё вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа Беленькой Светланы Валерьевны, представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, как по содержанию, так и по оформлению соответствует установленным требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (редакция №335 от 21.04.2016 г.), а сама Беленькая С.В. достойна присуждения ей искомой степени по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Гончар Данила Александрович,
кандидат биологических наук,
зам. директора по производству
ООО «СибЭнзайм».
Тел.: +7-(383)-412-96-07
E.mail: gonchar@sibenzyme.ru

Гончар Д.А.

Подпись к.б.н. Д.А. Гончара
ЗАВЕРЯЮ
Яковлев Владимир Георгиевич,
директор ООО «СибЭнзайм»,



Яковлев В.Г.

02 декабря 2021 г.