

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Беленькой Светланы Валерьевны

«Свойства рекомбинантного химозина алтайского марала (*Cervus canadensis sibiricus*)»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность. Аспарагиновые протеазы – широко распространенные в природе ферменты, обнаруженные у вирусов, бактерий, архей и эукариот. Выполняемый ими гидролиз пептидных связей в белках и пептидах является фундаментальной составляющей многих биологических процессов, а также широко используется в различных отраслях хозяйственной деятельности. В связи с этим изучение структурного разнообразия и биохимических свойств аспарагиновых протеаз является важной фундаментальной задачей.

Среди аспарагиновых протеаз особое место занимают химозины, физиологическая функция которых состоит в высокоспецифичном гидролизе каппа-казеина в желудке млекопитающих на ранних этапах постнатального развития. Повышенный интерес к химозинам обусловлен, в первую очередь, их ключевым значением для технологии изготовления сыров. Привлечение к исследованиям химозинов новых видов вызвано данными о том, что свойства конкретного фермента могут радикальным образом сказаться на технологическом процессе, а также на качестве и специфике конечного продукта. Соответственно, получение продуцентов химозина от новых видов может способствовать оптимизации производства и обогатить имеющийся ассортимент продукции.

Научная новизна. В диссертационной работе С.В. Беленькой впервые определена полная нуклеотидная последовательность гена химозина алтайского марала, установлена его экзон/интронная организация и реконструирована последовательность мРНК. Также впервые сконструированы экспрессионные вектора, обеспечивающие наработку рекомбинантного фермента в системе *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis* и получены соответствующие рекомбинантные штаммы - продуценты прохимозина алтайского марала. Кроме того, впервые для белка-представителя химозинов семейства Оленевых проведен анализ основных биохимических и технологических свойств

Структура диссертационной работы. Диссертация построена в соответствии с общепринятой схемой и изложена на 115 стр., включающих 130 цитированных публикаций, 11 таблиц и 22 рисунка. Обзор литературы

в его первой части содержит достаточно полную и хорошо систематизированную подборку сведений о структуре и свойствах аспарагиновых протеаз. Вторая часть обзора посвящена подробной характеристике представителя этого класса ферментов - химозина, включающей описание его физиологических функций, первичной и третичной структуры, а также технологических свойств в процессе выработки сыров. В целом обзор литературы читается с большим интересом, хотя оформление содержащихся в нем рисунков не лишено недостатков. Главы II и III диссертации, в которых изложены использованные в работе материалы и методы, а также полученные результаты и их обсуждение, в основном написаны достаточно подробно, четко и ясно. Однако, эти главы содержат ряд упущений, о которых будет сказано в разделе замечания. Завершают текст диссертации емкое и логически выстроенное заключение и хорошо сформулированные выводы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы С.В. Беленькой заключается прежде всего в расширении объема знаний о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях, вторичной и третичной структуре, а также биохимических свойствах ферментов группы химозинов, а также о связи структуры ферментов и их свойств, что имеет большие перспективы для инженерной энзимологии. Получен рекомбинантный аналог химозина алтайского марала, обладающий комплексом технологических свойств привлекательных для сыроделия, который может быть востребован предприятиями - производителями сыров. Самостоятельное биотехнологическое значение имеет также разработанный автором рекомбинантный вектор pSVB, способный обеспечить интеграцию в геном *Kluyveromyces lactis* экспрессионных кассет, содержащих автоиндуцибельный промотор. Данный вектор открывает перспективы для создания высокоэффективных дрожжевых продуцентов белков, востребованных в хозяйственной деятельности, в том числе рекомбинантных ферментов для пищевой отрасли и сельского хозяйства.

Автореферат. Автореферат по составу представленных результатов и сделанных выводов идентичен таковым в тексте диссертации С.В. Беленькой. Все полученные результаты апробированы на международных и отечественных конференциях и симпозиумах. Результаты диссертационной работы отражены в 5 публикациях в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК. Кроме того, автором получено 3 патента РФ.

Замечания:

1. При описании экзон- интронной структуры гена химозина алтайского марала (рис.3.2 диссертации) число интронов ошибочно было указано как 10 (на самом деле их 8). Эта же ошибка механически воспроизведена в выводе 1 и положениях, выносимых на защиту.
2. Ни в главе «материалы и методы», ни в главе «результаты» ни слова не сказано о том, с помощью каких методов были построены филогенетические деревья (рис. 3.1 и 3.3)
3. Описание получения препаратов рекомбинантного прохимозина алтайского марала при их наработке в системах *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis* (главы 3.3.-3.6. раздела «Результаты и обсуждение») выполнено довольно неровно. В частности, непонятно, почему только для химозина алтайского марала, полученного в системе экспрессии *E.coli* приводится рисунок (рис. 3.5), позволяющий судить как об исходном содержании целевого белка, так и о степени его конечной очистки, а для химозина полученного в системе экспрессии *K. lactis* никаких данных на этот счет не приводится. Также нигде не приводятся данные, характеризующие выход конечного продукта для препаратов прохимозина из этих двух источников.
4. Для почти всех приведенных в тексте диссертации рисунков характерно отсутствие подписей, помогающих понять его содержание, – как правило автор ограничивается лишь названием рисунка.
5. На ряде рисунков недостает информации. Например, на рис.1.3 и 1.10 были бы более информативными, если бы на них было показано расположение остатков аспарагиновой кислоты и щели (расщелины) активного сайта. Содержание некоторых рисунков (например, 1.1 и 1.12) не соответствует (или не полностью соответствует) их описанию в тексте. При этом рис. 1.12 в тексте упоминается как рис. 1.13.
6. Для текста диссертации характерно обилие не ничем не оправданных сокращений, в результате чего периодически читатель сталкивается с шифрограммами типа «МА, ПА и Специфичность» - так звучит один из подзаголовков в Обзоре литературы.

Однако сделанные замечания носят в основном редакционный характер и не снижают ценности диссертации Светланы Валерьевны Беленькой.

Заключение. Диссертация Беленькой Светланы Валерьевны «Свойства рекомбинантного химозина алтайского марала (*Cervus canadensis sibiricus*)», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является продуманной и законченной научно-квалификационной работой,

которая полностью соответствует профилю научной специальности 1.5.3 – молекулярная биология. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335, от 2 августа 2016г. №748, от 29 мая 2017г. № 650, от 28 августа 2017г. № 1024, от 01 октября 2018г. №1168 и от 20 марта 2021г. № 426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор - Беленькая Светлана Валерьевна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент

 /Т.И. Меркулова/

Меркулова Татьяна Ивановна

630090, Новосибирск, пр.ак.Лаврентьева,10
e.mail: merkulova@bionet.nsc.ru, Федеральное
государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского
отделения Российской академии наук»,
главный научный сотрудник лаборатории
регуляции экспрессии генов, доктор биологических наук,
профессор.

Подпись Меркуловой Т.И. заверяю
Начальник ОК ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН.




Л.А. Савенкова

от 12. 2021