

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 99.0.027.03,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ РОССИЙСКОГО ХИМИКО-
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ, ТВЕРСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО ТЕХНИЧЕСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ИНСТИТУТА БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело

№ _____

решение диссертационного совета
от «16» апреля 2024 года № 9

О присуждении Устинской Яне Витальевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата технических наук.

Диссертация «Разработка технологических основ синтеза биологически активных метаболитов фототрофными микроорганизмами» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите «13» февраля 2024 года (протокол заседания №1) диссертационным советом 99.0.027.03, созданным на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный технический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук (125047, Москва, Миусская площадь, 9, приказ о создании диссертационного совета от «28» сентября 2016 года №1172/нк).

Соискатель Устинская Яна Витальевна, «06» июля 1995 года рождения, в 2019 году окончила федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный технический университет». С 2019 года по настоящее время работает ассистентом кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» Тамбовского государственного технического университета. В 2023 году освоила программу подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре Тамбовского государственного технического университета.

Диссертация выполнена в Тамбовском государственном техническом университете Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – доктор технических наук, профессор Дворецкий Дмитрий Станиславович, заведующий кафедрой «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» Тамбовского государственного технического университета.

Официальные оппоненты:

Сироткин Александр Семенович – гражданин Российской Федерации, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Промышленной биотехнологии» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет»;

Политаева Наталья Анатольевна, гражданка Российской Федерации, доктор технических наук, профессор, профессор Высшей школы гидротехнического и энергетического строительства федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»,

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (Воронеж) в своем *положительном* отзыве, подписанном Корнеевой Ольгой Сергеевной, доктором биологических наук, профессором, заведующим кафедрой биохимии и биотехнологии, указала, что диссертационная работа Устинской Яны Витальевны является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных соискателем исследований предложены новые научно обоснованные технологические основы синтеза веществ антибактериального и стимулирующего действия фототрофными микроорганизмами, имеющие научную новизну и практическое значение в области промышленной биотехнологии. В полной мере удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции постановления от 25.01.2024), а ее автор – Устинская Яна Витальевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология (диссертационная работа обсуждена и одобрена на заседании кафедры биохимии и биотехнологии «28» февраля 2024 года, протокол № 7).

Соискатель имеет 48 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 14 работ, из них 8 работ в рецензируемых научных изданиях. Общий объем публикаций составляет 364 страницы. *В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах.* Все работы опубликованы с соавторами, личный вклад соискателя составляет более

70% и заключается в сборе и анализе литературных данных, планировании работ и получении экспериментальных результатов, участии в обработке и анализе полученных данных, написании и оформлении публикаций. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на трех международных и всероссийских научных конференциях; монографий и депонированных рукописей соискатель не имеет.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Temnov M.S., Ustinskaya Ya.V., Meronyuk K.I., Dvoretzky D.S. A. Study of Complex Cell Disruption Methods of Intracellular Water-Soluble Protein Extraction from *Chlorella sorokiniana* // *Industrial Biotechnology*. 2023. Vol.19. P.145-150. (**Scopus**).
2. Temnov M.S., Ustinskaya Ya.V., Eskova M.A., Meronyuk K.I., Dvoretzky D.S. Comparative analysis of disintegration methods of *Chlorella sorokiniana* cells that increase the efficiency of extraction of intracellular water-soluble proteins // *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2022. Vol. 65(4). P. 79-86. (**Scopus**).
3. Дворецкий Д.С., Темнов М.С., Маркин И.В., Устинская Я.В., Еськова М.А. Вопросы разработки эффективной биотехнологии синтеза ценных компонентов из биомассы микроводорослей // *Теоретические основы химической технологии*. 2022. Том 56. № 4. С. 418-433. (**Web of Science**).

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов, *все положительные*. В отзывах указывается, что представленная к защите диссертационная работа характеризуется высокой актуальностью, научной ценностью и имеет большое значение для теории и практики промышленной биотехнологии. Отзывы направили:

1. Шеламова Светлана Алексеевна, доктор технических наук, профессор кафедры товароведения и экспертизы товаров Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I» В отзыве приведены следующие замечания: «Таблицы обычно располагаются после их упоминания в тексте. Из комментария данных таблицы 3 (стр. 10) не понятно, что в отсутствие освещения ингибирующий эффект не наблюдался. При этом отсутствие ингибирующего эффекта для режима 3 и других условий не объясняется». «Не понятен смысл рисунка 4 – «Изменение концентрации редуцирующих сахаров» и характер зависимостей на нем».
2. Понаморёва Ольга Николаевна, доктор химических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет». В отзыве приведены следующие вопросы: «Почему для определения антибактериальной активности выбраны грамположительные бактерии?», «Как полученные результаты по определению антибактериальной активности согласуются с результатами других исследований?», «В таблице 4 указан состав неполярных веществ липидной фракции, который определяли методом тонкослойной хроматографии, однако нет информации об экстрагируемых компонентах, системах для разделения и

визуализации липидов. Как авторы определяли липидный состав этим методом, который не совсем количественный?».

3. Казуб Валерий Тимофеевич, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Физика и математика» Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет». В отзыве задан вопрос: «Из текста автореферата не ясно, каким образом оценивался срок годности и условия хранения исследуемых антибактериальных и стимулирующих соединений?».

4. Базарнова Юлия Генриховна, доктор технических наук, профессор, директор Высшей школы биотехнологий и пищевых производств федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого». В отзыве приведены следующие замечания и вопросы: «Из текста автореферата не ясно, какие именно грамположительные бактерии использовались в качестве тест-культуры при исследовании антибактериального действия»; «Имеется ли информация о качественном составе фракции водорастворимых пептидов, оказывающих ингибирующее действие на рост грамположительных бактерий?».

5. Варламова Наталья Валерьевна, кандидат биологических наук, доктор технических наук, старший научный сотрудник медико-биологического отдела федерального государственного автономного учреждения «Военный инновационный технополис «ЭРА». В отзыве приведены следующие замечания: «В работе не рассматривались вопросы утилизации побочных продуктов (петролейного эфира, клеточных остатков)»; «Имеются незначительные ошибки в оформлении текста автореферата, например, некоторые таблицы и рисунки, используемые в автореферате диссертации, размещены перед текстом, в котором впервые дана ссылка на них».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что они являются признанными специалистами в области медицинской биотехнологии, что подтверждается наличием соответствующих публикаций в ведущих научных рецензируемых изданиях, а также спецификой и профилем диссертационной работы, и выполнен в соответствии с пп. 22 и 24 «Положения о присуждении научных степеней» (постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 в действующей редакции).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: Предложен механизм комплексного действия различных методов дезинтеграции (ферментом лизоцимом, ультразвуком и СВЧ-излучением) клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на выход внутриклеточных водорастворимых белков.

Доказана закономерность влияния белого света на антибактериальное действие неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций из штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404.

Определено, что водорастворимая белковая фракция микроводорослей *Chlorella sorokiniana* может быть использована в качестве компонента питательной среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Теоретическая значимость исследований обоснована тем, что: Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования, в том числе, экспериментальных методик физико-химического анализа: спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, газовая хроматография. Раскрыты механизмы комплексного действия различных методов дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, а так же механизмы влияния белого света на антибактериальное действие неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций из штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404. Получены экспериментальные данные о значениях минимальных ингибирующих концентраций неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций на грамположительные бактерии. Доказана возможность использования водорастворимой белковой фракции микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в качестве компонента питательной среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Значение полученных соискателем результатов исследований для практики подтверждается тем, что: Разработана принципиальная технологическая схема, которая может быть использована для организации производства веществ антибактериального (в качестве антибактериальных агентов против грамположительных бактерий) и стимулирующего действия (в качестве фактора роста при культивировании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) на основе микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- выводы диссертации обоснованы и не вызывают сомнения и согласуются с современными подходами к выбору объектов и методов исследования;
- достоверность полученных результатов обеспечена использованием методик эксперимента, соответствующих современному научному уровню, и подтверждена их согласованностью;
- результаты получены с использованием сертифицированного оборудования, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях;
- теория построена на фундаментальных законах, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации.

Личный вклад соискателя состоит во включенном участии на всех этапах процесса, непосредственном участии в постановке основных задач исследования, получении исходных данных, проведении всех экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, разработке основных методов эксперимента, экспериментальных стендов и установок, личном участии в апробации результатов исследования, подготовке основных публикаций по выполненной работе.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Почему объекты исследования введены в цель работы (в общем, достаточно нестандартное решение)? Почему именно эти цианобактерии, почему именно эти микроводоросли?

2. Что значит мощность в килоджоулях?

3. Вопрос про технику эксперимента с ультразвуком. Вы с какими насадками ультразвуковых излучателей работали, потому что Вы мощность вроде как указываете, а объем, т.е. интенсивность обработки, которая опять же прикладывается к квадратным сантиметрам или к квадратным метрам не указываете? В чем обрабатывали? Это была ванна, стаканчик или цилиндр?

4. Как Вы контролировали температуру того, что в стаканчике? Температура же тоже влияет, когда Вы создаете кавитационные условия. Да, жидкость резко нагревается, да, создается избыточное давление, да, внутри клетки происходит разрыв, все это понятно. Температура влияет?

5. В обзоре литературы Вашей диссертации есть небольшой, но важный раздел по поводу сравнения методик экстракции липидов, и Вы приходите к совершенно правильному заключению, что наиболее оптимальным вариантом является экстракция хлороформ-метанолом. Собственно, эта методика является такой общепринятой, тем не менее, потом Вы используете для экстракции петролейный эфир. Как Вы можете объяснить это?

6. Проводилось ли сравнение полноты извлечения липидов стандартной методикой хлороформ-метанолом и петролейным эфиром?

7. В методике и затем в обсуждении используется фраза о том, что расчет кинетики метаболических путей, в частности, триглицеридов в клетке микроводорослей проводился с помощью компьютерной программы, соавтором которой является предполагаемый диссертант. Далее сказано, что нужно обратиться к приложению один, но там по поводу приведен только небольшой абзац, в котором говорится о количестве клеток, но не о метаболических путях триглицеридов. Что конкретно Вы подразумеваете под кинетикой метаболических путей, и какие реакции Вами были рассмотрены?

8. Вы говорили о том, что у Вас в составе липидной фракции наибольший ингибирующий эффект Вы получили для триацилглицеридов и жирных кислот. Но вы же не выделяли отдельные компоненты. На основании чего Вы сделали вывод, что именно эти фракции наиболее ингибирующие?

9. Можно охарактеризовать пептидную фракцию, размер этих пептидов, аминокислотный состав, ну что исследовали?

10. Вопрос, касающийся выводов работы. Четвертый вывод звучит так, что определено, что добавление водорастворимой белковой фракции микроводорослей Хлореллы приводит к повышению емкости популяции сахаромикетов. Что при этом Вы имеете в виду, что повышается емкость, или увеличение популяции? Что значит емкость популяции?

11. На 10 слайде 3 и 4 строчка. Написано, обработка ферментом 0 минут в обоих случаях. Так была обработка или нет? И в чем отличие от 2-х последних строчек?

12. На 9 слайде 1 строчка написано количество фермента 30 мг, выход 3% получается по массе. Вы пробовали другие концентрации лизоцима? И во 2 строчке пугает температура обработки 70 градусов, а потом Вы анализируете белки. Они нормально себя чувствуют при этом?

13. На 9 слайде у Вас контроль 24 градуса, а везде температура 38 градусов, 70 градусов, 37 градусов. Не кажется Вам, что это не совсем удачное сравнение?

14. Почему Вы выбрали лизоцим? С чего Вы взяли, что оптимальная температура действия лизоцима 37 градусов?

15. В отношении каких микроорганизмов Вы определяли антибактериальную активность?

16. Вы проверили антибактериальные свойства и привели минимальные ингибирующие концентрации. Интерпретации этих результатов я не увидел, хорошо ли это, плохо ли и т.д. Сравнивались ли эти концентрации с теми веществами, которым Вы разрабатывали аналог?

17. Как-то проводилась экономическая оценка или совсем не рассматривалась? У Вас предложена большая технологическая цепочка.

18. На 30 слайде приведена себестоимость, но сравнения нет, анализа нет. Вы говорите, анализ проводился. У Вас где-то это зафиксировано? Что это за анализ?

19. На 4 странице автореферата я нашел практическую значимость, теоретической не увидел. Что является теоретической значимостью?

20. На слайде с экономикой. Стоимость одного культивирования для получения пептидного экстракта 123 рубля, почему себестоимость при этом 27 рублей? Какой был выход каждого экстракта?

21. На слайде с пероксидными радикалами: это гипотеза или это как-то доказано? Образование пероксидных радикалов маловероятно, почему они вдруг образуются?

Соискатель Устинская Я.В. ответила на заданные ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

На первый вопрос автор пояснила, что выбор объектов обуславливался их производительностью, учитывалась продуктивность, скорость накопления биомассы и также способность адаптироваться к изменяющимся условиям культивирования. Также направленность целевых продуктов (интересовали в первую очередь липидные вещества и белковые соединения). И при написании литературного обзора было определено, что данные штаммы активно используются в различных исследованиях и являются перспективными продуцентами именно антибактериальных соединений.

На второй вопрос автор уточнила, что в данном случае учитывалась не мощность, а энергетические затраты.

На третий вопрос автор ответила, что использовался ультразвуковой гомогенизатор мощностью до 950 Вт и частотой 20-25 кГц. Обработку осуществляли в стаканчике, в который помещался ультразвуковой зонд, и производилась обработка.

На четвертый вопрос автор пояснила, что температура влияет на последующую обработку ферментом, если температура сильно завышена, то фермент уже не будет действовать, так как нужно, потому что оптимальные условия для него не подходят.

На пятый вопрос автор ответила, что стандартная методика подразумевает использование хлороформа, но в нашем случае, выбор экстрагента обуславливается его максимальной безопасностью и способностью извлекать именно неполярные липиды. Потому что при написании литературного обзора, было установлено, что антибактериальной активностью в большей степени обладают неполярные вещества, поэтому нас интересовали именно неполярные липиды, и экстрагент, который может извлекать именно неполярные соединения.

На шестой вопрос автор уточнила, что сравнения действия различных экстрагентов не проводилось. Был выбран конкретный экстрагент, который мог позволить извлечь необходимый целевой продукт.

На седьмой вопрос автор уточнила, что была разработана программа ЭВМ для расчета метаболических путей синтеза триацилглицеридов в клетке. В ней были рассмотрены реакции, которые подразумевают образование жирных кислот и триацилглицеридов в клетке. В приложении диссертации эта программа приведена.

На восьмой вопрос автор ответила, что проводилось исследование отдельных компонентов, которые были выделены на антибактериальное действие. Был сделан вывод, что триацилглицериды и жирные кислоты дают зоны ингибирования.

На девятый вопрос автор пояснила, что дальнейшие исследования по влиянию аминокислотного состава планируется. Сейчас можно предположить, что так как лучшим режимом культивирования клеток для пептидных экстрактов являлся режим, при котором накапливалось наибольшее количество биомассы, соответственно можно предположить такой вывод, что при данном режиме наиболее эффективно идет фотосинтез и соответственно, в водорастворимой фракции будет больше фермента рубиско, его аминокислотный состав можно проанализировать. В его составе содержится большее количество положительно заряженных аминокислот. Длину не исследовали.

На десятый вопрос автор уточнила, что под емкостью популяции подразумевается количество клеток в 1 мл.

На одиннадцатый вопрос автор уточнила, что ферментативная обработка была с последующей без задержки обработкой ультразвуком и СВЧ. Отличие в том, что была задержка: четыре часа была обработка ферментом и после воздействие ультразвуком и СВЧ.

На двенадцатый вопрос автор ответила, что другие концентрации исследовались. Был проведен эксперимент с различными концентрациями фермента и временем обработки. В диссертации они описаны. На основе этих экспериментов были выбраны лучшие режимы, которые вынесены.

Биологическая активность белков не исследовалась при обработке СВЧ-излучением, так как был выбран один режим ультразвуком.

На тринадцатый вопрос автор пояснила, что под контролем подразумевалась биомасса без предварительной обработки, при комнатной температуре.

На четырнадцатый вопрос автор ответила, что выбор фермента был обусловлен тем, что он промышленно используется, его стоимость невысока, и он непосредственно воздействует на мишени, которые находятся в клетке. Температура 37 градусов наиболее оптимальна для действия фермента исходя из литературных данных.

На пятнадцатый вопрос автор ответила, что была использована культура грамположительных бактерий, которая была выделена в лаборатории седиментационным методом и в дальнейшем она была исследована. Исследование показало, что она не является аксеничной культурой, но вероятней всего, принадлежит к роду *Bacillus*.

На шестнадцатый вопрос автор ответила, что те результаты, которые получены, сравнивались с уже известными результатами, которые представлены в исследованиях. Потенциально можно сказать, что данные вещества, которые получены, могут использоваться в биоремедиации для очистки сточных вод, в сельском хозяйстве.

На семнадцатый вопрос автор ответила, что было рассчитано производство антибактериальных пептидов и себестоимость экстрактов. Себестоимость сравнивалась с аналогами.

На восемнадцатый вопрос автор уточнила, что та себестоимость, которая была рассчитана, сравнивалась с ценой, представленных на рынке экстрактов.

На девятнадцатый вопрос автор ответила, что теоретической значимостью являются режимы культивирования и дезинтеграции, которые позволят получить вещества, обладающие антибактериальным действием в отношении грамположительных бактерий и стимулирующим действием.

На двадцатый вопрос автор уточнила, что из стадии вышло пептидного и водного экстракта порядка 5 мл, липидного экстракта порядка 2 мл.

На двадцать первый вопрос автор пояснила, что представлена теория Баха-Энглера, которая подразумевает окисление ненасыщенных соединений под действием света.

На заседании «16» апреля 2024 года диссертационный совет за новые научно обоснованные технические и технологические решения по разработке технологических основ синтеза биологически активных метаболитов фармацевтического назначения фототрофными микроорганизмами, имеющие существенное значение для промышленной биотехнологии, принял решение присудить Устинской Яне Витальевне ученую степень кандидата технических наук.

Диссертация соответствует требованиям в пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (в действующей редакции).

По своему содержанию диссертация отвечает паспорту научной специальности 1.5.6. Биотехнология по направлениям исследования 2 (в части: технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов...), 3 «Микробная и клеточная биотехнология», 5 «Коллекции микробных и клеточных культур биотехнологического назначения». Результаты могут быть рекомендованы для ознакомления и внедрения в образовательных, научных организациях и на предприятиях, где ведутся исследования и разработки в области культивирования фототрофных микроорганизмов-продуцентов.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 15 докторов наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» – 16 (шестнадцать), против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета

Виктор Иванович Панфилов

Ученый секретарь

диссертационного совета

Ирина Васильевна Шакир

16 апреля 2024 года

