

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертацию Устинской Яны Витальевны по теме «Разработка технологических основ синтеза биологически активных метаболитов фототрофными микроорганизмами», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология

Представленная диссертация представляет собой поисковое научное исследование комплексного характера, включающее большой объем различных лабораторных исследований по культивированию микроводоросли *Chlorella sorokiniana* и цианобактерии *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404, определение основных параметров их роста, оценка биосинтеза внутриклеточных белков и липидов, исследование их антибактериальных и биостимулирующих свойств, построение регрессионных зависимостей процесса дезинтеграции клеток микроводорослей различными методами, разработка предложений по реализации полученных результатов в производственной практике.

**Актуальность темы диссертации** определяется перспективами исследования и использования фототрофных микроорганизмов - микроводорослей и цианобактерий в различных прикладных областях с точки зрения получения биологически активных веществ в составе их биомассы. Помимо широкого спектра соединений, которые они синтезируют в процессе жизнедеятельности, биотехнологическая ценность фототрофных агентов обусловлена достаточно высокими скоростями роста и возможностью регулировать биосинтез целевых продуктов изменением условий культивирования.

Несмотря на значительные успехи в изучении и практическом применении микроводорослей и цианобактерий, многие вопросы, касающиеся производства отдельных целевых компонентов из их биомассы, требуют проведения современных исследований и разработки экономически обоснованных предложений для реализации на практике.

**Цель работы** состоит в разработке технологических основ синтеза биологически активных метаболитов микроводорослями *Chlorella sorokiniana* и цианобактериями *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 и формулировании технологических предложений для их практического применения.

**Характеристика содержания диссертации**

Диссертация изложена в классической манере построения её содержания, занимает 163 страницы, содержит 35 рисунков, 52 таблицы и включает введение, четыре главы, выводы и список литературы, включающий 219 наименований, а также 2 приложения в виде свидетельств о государственной регистрации программ для ЭВМ.

**Во введении** обсуждена актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, а также научная новизна и практическая значимость работы.

**Первая глава** представлен аналитический литературный обзор, в котором рассмотрены микроводоросли и цианобактерии как перспективные биообъекты для получения веществ антибактериального и стимулирующего действия. По результатам анализа многочисленных литературных данных выявлено, что вещества липидной природы, пептиды и белковые гидролизаты фототрофных микроорганизмов могут проявлять антибактериальную активность. Одновременно с этим, как показывают исследования водных экстрактов микроводорослей, они способствуют регенерации и росту микробных клеток вследствие содержания в своем составе белков и нуклеиновых кислот как комплексных обогатителей питательных сред. В части использования микроводорослей в качестве источника биологически активных эндометаболитов рассмотрены условия их культивирования и перспективные методы дезинтеграции клеток фототрофных микроорганизмов для эффективного извлечения эндометаболитов в среду культивирования.

**Вторая глава** посвящена описанию биообъектов и основных методик экспериментальных исследований, аналитического контроля процессов, обработки полученных данных.

**В третьей главе** изложены теоретические предпосылки и результаты экспериментальных исследований процессов культивирования микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404, накопления биологически активных метаболитов и их антибактериальных и стимулирующих свойств. В частности, автором установлено, что ключевые физико-химические условия культивирования (уровень фотосинтетически активной радиации (ФАР) и температура) в определенных режимах оказывают значительное влияние на содержание неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков в биомассе клеток исследованных культур

микроводорослей и цианобактерий, а также на эффективность антибактериального действия неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций.

Доказана эффективность последовательного использования ультразвука и фермента лизоцима для разрушения клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* с целью извлечения внутриклеточных водорастворимых белков, которое позволяет увеличить их содержание в экстракте в 14,7 раз по сравнению с образцом клеточной суспензии без предварительного разрушения.

Автором предложен механизм влияния освещенности на интенсивность антибактериального действия неполярных веществ липидной природы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404, связанный с перекисным окислением липидов и образованием продуктов с высокой токсичностью, а также гипотеза антибактериального действия пептидных фракций, направленного на деформацию структуры клеточной мембраны грамположительных бактерий.

Кроме того, экспериментально определено, что водорастворимая белковая фракция, синтезированная в процессе культивирования микроводорослей как в темноте, так и в условиях освещенности, будучи экстрагированной из клеточной биомассы, в определенных концентрациях отличается стимулирующими свойствами в отношении клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и может быть использована в составе питательной среды в качестве их комплексного обогатителя.

**В четвертой главе** представлен анализ аппаратурно-технологического оформления производства веществ антибактериального действия на основе микроводорослей *Chlorella sorokiniana*. Произведен расчет материального баланса, подобрано и рассчитано оборудование для производства антибактериальных пептидов из микроводорослей *Chlorella sorokiniana*. Предложена аппаратурно-технологическая схема производства биологически активных метаболитов из данного штамма микроводорослей.

Наконец, **в приложении** автор приводит свидетельства о регистрации программ для ЭВМ «Расчет концентрации клеток микроводорослей в суспензии» и «Расчет кинетики метаболических путей глутамина и триацилглицеринов в клетке микроводорослей».

**Достоверность результатов**, полученных в диссертационной работе, не вызывает сомнений и подтверждается использованием современных инструментальных методов исследования и метрологической обработки данных, а также воспроизводимостью полученных результатов.

**Новизна проведенных исследований, полученных результатов и выводов**, сформулированных в диссертации, определяется, в частности, тем, что выявлена закономерность влияния белого света на антибактериальное действие неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404.

Получен большой массив новых экспериментальных данных по исследованию эффективных режимов дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 для обеспечения наибольшего выхода целевых продуктов - внутриклеточных водорастворимых белков и неполярных веществ липидной природы. Обосновано использование комплекса последовательной обработки биомассы ультразвука и фермента с целью дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* для обеспечения максимального извлечения внутриклеточных водорастворимых белков.

Доказано использование водного белкового экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в качестве компонента питательной среды 0,005–0,01 % (об.) для повышения эффективности культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* по увеличению плотности популяции дрожжей на 21 % и увеличению удельной скорости роста в экспоненциальной фазе в 1,4 раза по сравнению с контролем.

**Практическая значимость полученных автором результатов** определяется в частности, тем, что изучены и определены технологические параметры культивирования микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404, обеспечивающие максимальное накопление неполярных липидов и водорастворимых белков в биомассе, проявляющих антибактериальный эффект в отношении грамположительных бактерий, а также определены методы дезинтеграции биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* для дальнейшей эффективной экстракции водорастворимых белков из культуральной жидкости.

В результате выполненной работы проведены технологические расчеты и предложена аппаратурно-технологическая схема производства веществ антибактериального и стимулирующего действия на основе микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

На основании сказанного выше следует сделать вывод, что выполненное диссертационное исследование Устинской Я.В. отличается поисковым характером и имеет очевидную научную ценность как с теоретической, так и с практической точек зрения.

**Автореферат отражает основные положения диссертационной работы и соответствует содержанию диссертации.** Тем не менее, автореферат написан очень конспективно, в отдельных случаях без дополнительных комментариев к полученным результатам.

Материалы диссертации достаточно полно освещены в публикациях автора: основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 14-ти печатных работах, в том числе в 1-й статье в изданиях из перечня, рекомендованного ВАК Минобрнауки России, 7-ти печатных работах, входящих в международные реферативные базы Scopus и Web of Science, а также в 2-х свидетельствах о государственной регистрации программ для ЭВМ.

**По диссертационной работе имеется ряд замечаний и вопросов, в основном, методического плана, а именно:**

1. Обзор литературы выполнен без финального заключения по его итогам. Впрочем, это можно отнести к стилю автора.

2. С. 65 диссертации. Бактериальная тест-культура, использованная для оценки антибактериальных свойств полученных экстрактов неполярных липидов и водорастворимых белков, таксономически с «некоторой вероятностью» отнесена к р. *Bacillus*. С какой степенью идентичности тест-культура отнесена к р. *Bacillus*, и какой метод был использован для идентификации культуры?

3. Глава 2 является недостаточно информативной. Так, в ней не описаны использованный для культивирования фотобиореактор (геометрические размеры, рабочий объем, особенности конструкции и т.п.), установки для УЗ-обработки, СВЧ-излучения (конструкции, функционал, производительность и т.п.)

4. Далее, в этой же главе на с. 69 диссертации указано, что «для извлечения белков из клеток микроводорослей осуществляли дезинтеграцию клеток в виде

пасты влажностью 98 – 99 % с использованием ультразвука». Биомасса с такой влажностью – это водная суспензия клеток, но никак не паста.

5. Не указано, на какой среде культивировали культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и какая их раса (штамм) использовалась для проверки стимулирующего действия водного белкового экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*?

6. Считаю, что с учетом большого объема и инвариантности проведенных экспериментов для более ясного и понятного представления их последовательности следовало бы привести схему проведения экспериментальных исследований.

7. С. 7-8 автореферата. В результате первоначальных исследований в различных режимах культивирования цианобактерии *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 представляются более производительными продуцентами, чем микроводоросли *Chlorella sorokiniana* по накоплению биомассы 19,6 и 0,36 г/л, по накоплению неполярных соединений липидной природы 18,5 и 9,6 %, соответственно. В связи с чем дальнейшие исследования были сфокусированы на микроводорослях *Chlorella sorokiniana*, вплоть до разработки аппаратурно-технологических схем получения целевых продуктов?

8. Когда речь идет о выходе водорастворимых белков, например, в 8,8 раза (до 12,3 %) большем по сравнению с контрольным образцом (1,4 %) (с. 84), при использовании различных методов дезинтеграции, о каком контрольном образце идет речь? Если это клетки, которые не подвергались дезинтеграции, то не следует ожидать выхода внутриклеточных белков.

9. Рис. 33 на с. 105 прокомментирован автором, как преобразование сахарозы в редуцирующие сахара (глюкоза и фруктоза) в процессе культивирования дрожжей. Почему полученные в результате конверсии глюкоза и фруктоза не потребляются дрожжами, а накапливаются в среде?

10. В связи с чем водный белковый экстракт микроводорослей *Chlorella sorokiniana* был испытан в качестве стимулятора развития дрожжей, но не испытан в этом качестве для бактерий - важнейших продуцентов, например, молочнокислых бактерий?

11. В связи с чем в качестве стимулятора развития дрожжей использовался белковый экстракт микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, но не был испытан белковый экстракт *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404?

12. Научные положения, выносимые на защиту, (на с. 5 в автореферате, с. 8, 9 в диссертации) стилистически сформулированы неверно. В этом случае следовало указать в качестве заголовка «На защиту выносятся».

13. В диссертации встречаются неудачные выражения, такие как:

- «Определяли концентрацию клеток микроводорослей и цианобактерий в суспензии гравиметрическим методом » (с. 69): скорее нужно говорить не о концентрации, а о сухом весе биомассы клеток;

- «... на питательную среду вносилось 50 мкл грамположительных бактерий...» (с. 88), в то время как речь о 50 мкл *суспензии* грамположительных бактерий;

- «масса биомассы»;

- «емкость популяции» (правильнее говорить о плотности популяции). Не обошлось и без досадных опечаток, таких как в формуле (7) на с. 72:  $g=0,963/\mu$  (правильно  $0,693/\mu$ );

- «Сушку *клеток* микроводорослей осуществляли в термостате...» (с. 69): после дезинтеграции ультразвуком и ферментом *клеток* в среде уже нет, и речь идет о сушке биомассы или клеточных компонентов.

14. Считаю, что лучше вывод 5 по диссертации звучал бы «Разработана аппаратно-технологическая схема...».

Отмеченные замечания не снижают значимости выполненной работы и имеют рекомендательный характер.

**В заключении** следует отметить, что представленная диссертация отличается актуальностью темы, новизной полученных результатов и их практической значимостью, удовлетворяет критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п.п. 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)

Таким образом, диссертация Устинской Яны Витальевны является научно-квалификационной работой, в которой содержатся изложены новые научно обоснованные технические и технологические решения и разработки в области получения и исследования свойств биологически активных метаболитов в процессах культивирования микроводорослей и цианобактерий, имеющие существенное значение для развития методов прикладной биотехнологии, а ее

автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология.

Официальный оппонент:

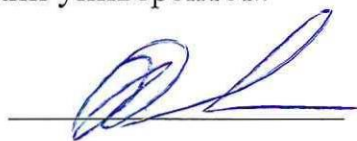
доктор технических наук по специальностям

03.00.23 - Биотехнология и 03.00.16 - Экология,

профессор, заведующий кафедрой «Промышленная биотехнология»

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский

технологический университет»



Сироткин Александр Семенович

Тел. +7(843) 231-95-75, +7(843) 231-89-19, +7(843)231-43-28

e-mail: SirotkinAS@corp.knrtu.ru

Подпись Сироткина А.С. удостоверяю

Ученый секретарь Ученого совета



И. В. Рагидулина

25 марта 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

420015, Казань, ул. Карла Маркса, 68

+7 (843) 231-42-16

office@kstu.ru