

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Богатыревой Алены Олеговны «Оптимизация условий биосинтеза бактериальной целлюлозы и получение на ее основе биокomпозиционных материалов с антибактериальными свойствами» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Решение диссертационного совета от 23 июня 2021 г. №6 о присуждении Богатыревой Алене Олеговне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация **Богатыревой Алены Олеговны «Оптимизация условий биосинтеза бактериальной целлюлозы и получение на ее основе биокomпозиционных материалов с антибактериальными свойствами»** по специальности – 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 15 апреля 2021 г. протокол №3 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель Богатырева Алена Олеговна, 1991 года рождения, гражданка РФ, в 2014 г. окончила с отличием ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» по специальности 24.09.01 Биотехнология. В период 2014-2018 гг. проходила обучение в очной аспирантуре ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», по окончании аспирантуры присуждена квалификация «Преподаватель-исследователь» С 2018 г. работает преподавателем кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва».

Научный руководитель – Ревин Виктор Васильевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, биоинженерии и биохимии, декан факультета биотехнологии и биологии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва».

Официальные оппоненты:

Ефременко Елена Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией экибиокатализа кафедры химической энзимологии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Гладышева Евгения Константиновна, кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук дали положительные отзывы.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» - в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа Богатыревой А.О., посвященная оптимизации процесса получения бактериальной целлюлозы, и получению на её основе гидрогелевых биоконпозиционных материалов с антибактериальными свойствами, является завершённой научно-квалификационной работой. Диссертационная работа соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а сама автор, Богатырева А.О., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии и биотехнологии. Так, доктор биологических наук Ефременко Елена Николаевна известна своими исследованиями в области образования биопрепаратов (бактериальной целлюлозы, экзополисахаридов, этанола). Гладышева Евгения Константиновна, кандидат технических наук известна своими работами в области исследования образования и исследования свойств бактериальной целлюлозы. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области разработки технологий промышленного производства широкого круга биопрепаратов, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 3 статьях и 1 патенте в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. Сапунова Н.Б., **Богатырева А.О.**, Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальной целлюлозы на среде с мелассой // Вестник технологического университета. – 2016. – Т. 19. – № 24. – С.154-156.

2. Ревин В.В, Лияськина Е.В., Сапунова Н.Б., **Богатырева А.О.** Выделение и характеристика штаммов - продуцентов бактериальной целлюлозы // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 1. – С. 88-98.

3. Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., **Bogatyreva A.**, Schankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // Brazilian journal of microbiology. – 2018. – Vol. 49. – I. 4. – P. 788-796.

4. Патент № 2733137, Российская Федерация. Способ получения биокомпозита с регенерационными свойствами на основе гидрогеля бактериальной целлюлозы / Лияськина Е.В., **Богатырева А.О.**, Ревин В.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (RU) – опубл. 29.09.2020

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: 1) Международной научно-практической конференции «Инновационная наука и современное общество» (Уфа, 2014); 2) Всероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке» (Саранск, 2015); 3) 69-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского Институт биологии и биомедицины (Нижний Новгород, 2016); 4) XV Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2016); 5) 9TH ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICALLY INSPIRED COGNITIVE ARCHITECTURES (2018); 6) 2-й Российском микробиологическом конгрессе (Саранск, 2019);

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Ефременко Елены Николаевны, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

По литобзору:

информация, представленная в разделе 1.4. «Процессы, происходящие при заживлении ран кажется излишней для этой работы, а пункт 1.5.1 «Гидрогели – перспективные материалы для биомедицины» логичнее было бы расположить перед пунктом 1.5 «Применение бактериальной целлюлозы в медицине». Раздел 1.5.2.2 «Характеристика хитозана» лучше было бы перенести в состав раздела 1.5.3 Композиты бактериальная целлюлоза – хитозан, который составил менее 1,5 страниц. По литературному обзору лучше было бы сделать обобщающее заключение, воедино связывающее весь представленный обширный материал.

По материалам и методам:

в разделе 2.2.1 в качестве основы для экспериментальных сред выступали отходы биотехнологических производств - меласса и спиртовая барда с различными добавками. Не указана информация по источникам получения субстратов, что за добавки вносились (далее из текста ясно, что это были дрожжевой экстракт, желатин, крахмал, ксантан и т.д), их характеристики отсутствуют, источники получения не указаны.

По результатам и обсуждению:

- в результате оптимизации и масштабирования условий получения БЦ были существенно снижена степень кристалличности конечного продукта (с 83% до 54,6%), и это, согласно выводам автора, было получение БЦ с «заданными» свойствами. Из текста не ясно, зачем были заданы именно такие свойства, если автор много раз в тексте работы подчеркивает важность получения БЦ именно с высокой степенью кристалличности;
- для ключевых данных, представленных в табл. 30 диссертации (табл.13 в автореферате), не указана применяемая концентрация фузидината натрия;
- в задачах исследования и выводе №2 написано про снижение себестоимости готового продукта, но прямых экономических оценок в работе нет;

По автореферату:

часто текст просто дублирует цифровые данные, представленные в таблицах и на рисунках.

Отзыв официального оппонента кандидата технических наук Гладышевой Евгении Константиновны, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. Объектом исследования данной диссертационной работы является продуцент бактериальной целлюлозы – штамм *Komagataeibacter sucrofermentans* H-110 (ВКПМ В-11267), выделенный из чайного гриба. Однако в разделе 2.1 Объекты исследования отсутствует информация об его идентификации. В разделе 2.2.1 Условия культивирования ...написано, что «...полученным инокулятом, в количестве 10% от объема среды, засекали опытные колбы, содержащие 100 мл среды ...». Какое количество клеток уксуснокислых бактерий содержалось в данном объеме инокулята?
2. Отходами каких производств являлись послеспиртовая барда и меласса? И подвергались ли данные питательные среды предварительной обработке до внесения продуцента? В главе 2 объекты и методы информация об этом отсутствует.
3. С. 106 «Из полученных данных видно, что при добавлении в среду органических кислот наблюдается заметное увеличение рН культуральной жидкости после культивирования, что может свидетельствовать о том, что при потреблении кислот из питательной среды микроорганизмы в меньшей образуют побочные продукты, в виде органических кислот». Описание не соответствует экспериментальным данным, представленным в таблице. Увеличение рН происходит только в нескольких случаях.
4. При изучении образования бактериальной целлюлозы на барде с мелассой автор делает вывод, что уменьшение выхода целлюлозы при увеличении концентрации мелассы связано с образованием глюконовой кислоты. Однако в работе отсутствуют количественные данные об изменении концентрации глюконовой кислоты в процессе культивирования *Komagataeibacter sucrofermentans* H-110, поэтому данный вывод не является правомерным.
5. Пункт 3.2.2.5 Изучение влияния полисахаридов на синтез бактериальной целлюлозы. Проводились ли исследования влияния полисахаридов на физико-химические свойства БЦ?
6. Сильной стороной работы является анализ рентгеноструктурных характеристик образцов БЦ, полученных на разных питательных средах. Степень кристалличности индекс кристалличности не коррелируют между собой. Чем отличаются данные показатели и как можно объяснить расхождения?
7. Отсутствует сравнение полученных в работе данных РСА с данными, представленными в литературе. Также отсутствует сравнение с мировым уровнем данных о количестве бактериальной целлюлозы, получаемой на средах из отходов биотехнологических производств.

8. Непонятно словосочетание «меласная среда, содержащая 50 г/л мелассы» (с. 148). Следовало указать концентрацию сахаров или сахарозы в разбавленной стандартизованной среде, так как состав мелассы непостоянен. Проводилась ли очистка мелассы от летучих кислот и красящих веществ, и если нет, то каково было их содержание в культуральной среде? Известно, что эти примеси могут оказывать существенное влияние на рост микроорганизмов и микробиологический синтез их метаболитов. Какие еще компоненты содержит «меласная среда», кроме мелассы?

Отзыв ведущей организации Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"— отзыв положительный. Замечания:

1. Ошибочное написание «Грам положительных» и «Грам отрицательных» вместо грамположительных и грамотрицательных бактерий по тексту диссертации. Встречаются и другие единичные опечатки, но их мало и они не мешают восприятию текста.
2. Глава 2 методы, раздел «2.2.11 Определение антибактериальной активности гидрогелей» не указано происхождение тест-штаммов бактерий, на которых определяли антибактериальные свойства гидрогелей (взяты из чьих-то коллекций? Выделены автором?)
3. Чем обусловлены рекомендованные автором в подглаве 3.3 разные оптимальные режимы и выбор добавок и питательных сред для биореакторов разного объема при масштабировании процессов культивирования продуцента? В разделе также желательно было бы привести технологическую схему получения БЦ в реакторе.
4. В таблицах 26, 27, и 28 автор приводит значения диаметра подавления тивности тест-организмов без учета диаметра лунки. Как правило, диаметр лунки учитывается при измерении. В таблицах также указана единица измерения на 1 см², вместо мм диаметра зоны ингибирования. Чем обусловлен выбор фузидиевой кислоты в комплексе с хитозаном для подавления грамотрицательных тест-организмов, если известно, что она не оказывает на них активность?

На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:

1. Карначук О.В. – дбн, профессор, зав. кафедрой физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Томского государственного университета.
2. Киселева И.С. – кбн, доцент, зав. кафедрой экспериментальной биологии и биотехнологии Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»
3. Русанов А.М. – дбн, профессор, зав. кафедрой биологии и почвоведения Оренбургского государственного университета
4. Смирнов В.Ф. – дбн, профессор, зав. отделом химико-биологических исследований Научно-исследовательского института химии Нижегородского госуниверситета.

«... оценка бактериальной активности, изложенной в табл. 11, 12 автореферата, производится на основе анализа зон ингибирования, тогда как в табл. 13 – на основе измерений величины КОЕ.»

5. Терентьев К.Ю. – ктн, ио. зав. кафедрой биологии, экологии и биотехнологии, ФГАОУ ВО «САФУ М.В. Ломоносова» (Северный Арктический Федеральный университет, г. Архангельск) .

1. По данным, представленным на рис. 1, наиболее эффективными источниками углерода для синтеза бактериальной целлюлозы оказались манит и глицерин. Однако в дальнейшем автор работала не с ними. Для чего автором были даны данные по широкому спектру субстратов?

2. Для оценки эффективности культивирования и биосинтеза бактериальной целлюлозы целесообразно представить данные по ее выходу от потребленного субстрата

3. На странице 7 автореферата сказано, что «выход увеличивается на 95% относительно контроля». Что автор использовала в качестве контроля из контекста не понятно?

4. Послеспиртовая барда и меласса являются комплексными средами, содержащими помимо основных питательных источников ростовые факторы и прочие эффекторы. В барде можно предположить наличие остаточных спиртовых продуктов, которые являются достаточно эффективными С-источниками (рис. 1). Из текста автореферата не ясно, проводился ли более глубокий анализ этих сред (барда и меласса), а также готовили ли их дополнительно перед культивированием клеток.

6. Фокина В.В. – кбн, снс лаборатории микробиологической трансформации органических соединений, ИБФМ РАН, обособленного подразделения ФИЦ «Пушкинского научного центра биологических исследований РАН.

- в разделе «Культивирование» указано, что «культивирование продуцента осуществляли в биореакторах BIOSTAT A, BIOSTAT B и BIOSTAT C plus объемом 1, 3 и 30 литров», а далее указываются объемы 1, 6 и 30 л.

- в главе «Результаты» указано, что «на первом этапе изучали продуктивность штамма в процессе культивирования на различных питательных средах, потребление сахаров, а также свойства БЦ при использовании стандартной среды HS». Однако, судя по приведенным результатам, изучали продуктивность штамма в процессе культивирования на питательной среде HS, модифицированной по источнику углерода, потребление сахаров, а также свойства БЦ оценивали при использовании стандартной и модифицированной среды HS.

- При описании биосинтеза бактериальной целлюлозы на средах с мелассой и бардой было бы желательно привести общую характеристику этих субстратов (содержание остаточного этанола и органических кислот в барде; содержание сахаров в мелассе и др.).

- Поскольку в задачи исследования включены меласса и барда, как относительно дешевые источники углеродного субстрата для целей создания технологии производства бактериальной целлюлозы с более низкой себестоимостью,

желательно приведение каких-либо экономических оценок, например, по примерному снижению себестоимости при использовании отходов биотехнологических производств.

7. Воронова М.И. – кхн, снс лаборатории «Физическая химия гетерогенных систем полимер-жидкость» ФГБУН Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН.

- используемый в тексте автореферата термин «количество БЦ, г/л», например, рис. 1, таблица 6 и др лучше заменить на «продуктивность» или «выход»

- в работе соискатель не использует такую характеристику целлюлозы как «степень полимеризации», которая является важной с точки зрения практического применения полученных композитов.

- в чем заключался процесс масштабирования кроме изменения объема реактора? Какие критерии подобия были использованы для масштабирования процесса биосинтеза БЦ?

- не проиндексированы дифракционные пики БЦ на дифрактограммах (рис. 7)

- согласно данным таблицы 6, при скорости перемешивания 300-350 об/мин выход БЦ уменьшается с увеличением степени аэрации. Эта зависимость, скорее всего, имеет максимум. Какой степени аэрации соответствует максимальный выход БЦ? Оценивалось ли содержание кислорода в среде в процессе аэрации?

Все отзывы положительные.

Вопросы задавали: дбн Равин Н.В., дбн Варламов В.П., дбн Летаров А.В., дбн Терешина В.М., дбн Пименов Н.В.

В дискуссии приняли участие: дбн Летаров А.В., дбн Терешина В.М., дбн Пименов Н.В.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Богатыревой А.О., посвященная оптимизации процесса получения бактериальной целлюлозы, и получению на её основе гидрогелевых биокомпозиционных материалов с антибактериальными свойствами, является завершённой научно-квалификационной работой.

В работе впервые изучено образование БЦ штаммом *Komagataeibacter sucrofermentans* В-11267 на стандартной среде HS с различными источниками углерода. В ходе исследования были подобраны условия синтеза полисахарида на средах с отходами биотехнологических производств: мелассой и послеспиртовой бардой. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование данных питательных сред позволяет не только снизить себестоимость готового продукта, но и увеличить выход полисахарида по сравнению со стандартной средой.

Экспериментально доказано, что использование мелассы и послеспиртовой барды позволяет получить полимер с улучшенными характеристиками по сравнению с целлюлозой, полученной на стандартной среде. Впервые проведено масштабирование процесса получения БЦ с помощью *K. sucrofermentans* В-11267 в биореакторах объемом 1, 6 и 30 л, и изучено влияние условий культивирования на выход и структуру БЦ.

Впервые созданы гидрогелевые композиты на основе БЦ, хитозана и фузидовой кислоты. Установлено, что наилучшими характеристиками обладали композиты с соотношением БЦ :хитозан

50:50 и 20:80 с добавлением 1% глутарового альдегида. Гидрогели показали хорошую влагосвязывающую способность и при включении фузидина натрия обладали высокой антибактериальной активностью.

Полученные в работе результаты позволяют не только расширить представления о биосинтезе бактериальной целлюлозы при различных условиях культивирования, но и показать высокий потенциал штамма *K. sacrofermentans* В-11267 для промышленного получения БЦ с заданными свойствами, а также продемонстрировать возможность получения новых функциональных биокомпозиционных гидрогелевых композитов медицинского назначения на основе данного полисахарида.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что в ходе работы были расширены представления о биосинтезе бактериальной целлюлозы штаммом *K. sacrofermentans* В-11267 на средах различного состава. Было изучено влияние различных источников углерода, азота, а также других эффекторов на выход и структуру БЦ. В результате проведенной работы была проведена оптимизация среды выращивания на основе отходов биотехнологических производств. В ходе работы показано влияние условий культивирования на физико-химические свойства полимера. Подобраны оптимальные условия культивирования для продуцента целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267. Впервые получены антимикробные гидрогелевые композиты на основе бактериальной целлюлозы и хитозана, а также антибиотика фузидина натрия.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанный способ получения бактериальной целлюлозы может служить основой для создания промышленной биотехнологии получения данного полимера. Полученная целлюлоза может быть использована во многих сферах науки и техники. В данном исследовании показана возможность применения БЦ для получения композитных гидрогелевых материалов, обладающих антимикробными свойствами. Данные материалы могут быть использованы для заживления ран и ожогов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что полученные результаты являются воспроизводимыми и достоверными, а выводы и положения обоснованными. При выполнении диссертационной работы применялся комплекс микробиологических и физико-химических методов, а также статистический анализ данных.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в их числе 3 статьи в журналах, утвержденных ВАК, и в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, а также 1 патент, и тезисы докладов на российских и международных конференциях. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, включая планирование и постановку экспериментов, анализ и статистическую обработку экспериментальных данных, апробацию основных положений работы на различных конференциях, подготовку публикаций по теме работы.

Диссертация **Богатыревой Алены Олеговны «Оптимизация условий биосинтеза бактериальной целлюлозы и получение на ее основе биокомпозиционных материалов с антибактериальными свойствами»** является законченной научно-квалификационной работой, которая посвящена оптимизации процесса получения бактериальной целлюлозы, и формированию на её основе гидрогелевых биокомпозиционных материалов с антибактериальными свойствами.

Работа соответствует профилю Диссовета Д002.247.02 и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с п.9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

На заседании 23 июня 2021 г. Диссертационный совет принял решение присудить **Богатыревой Алене Олеговне** ученую степень кандидата биологических наук по специальности – 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 16 чел., из них 7 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 16, «против» - 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета Д002.247.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук



Н.В. Пименов

Ученый секретарь
диссертационного совета Д002.247.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук

Т.В. Хижняк

23 июня 2021 г.