

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.02 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 Назаровой Натальи Борисовны «Оптимизация условий культивирования выделенных штаммов *Komagataeibacter hansenii* и *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) sucrofermentans* для получения бактериальной целлюлозы и новых функциональных материалов на ее основе» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Решение диссертационного совета от 15 июня 2022 г. №5 о присуждении Назаровой Наталье Борисовне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Назаровой Натальи Борисовны «Оптимизация условий культивирования выделенных штаммов *Komagataeibacter hansenii* и *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) sucrofermentans* для получения бактериальной целлюлозы и новых функциональных материалов на ее основе» по специальности – 1.5.6. – Биотехнология принята к защите 25 марта 2022 г. протокол № 2 диссертационным советом 24.1.233.02 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 Назарова Наталья Борисовна, 1993 года рождения, гражданка РФ, в 2015 г. окончила ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» по специальности инженер-биотехнолог. В период 2015-2019 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 2019 г. работает преподавателем кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». Диссертационная работа Назаровой Натальи Борисовны «Оптимизация условий культивирования выделенных штаммов *Komagataeibacter hansenii* и *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) sucrofermentans* для получения бактериальной целлюлозы и новых функциональных материалов на ее основе» выполнена на кафедре биотехнологии и биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева».

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:

доктор биологических наук, Татьяна Ильинична Громовых (профессор, заведующий кафедрой ХимБиоТех, факультета химической технологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский политехнический университет») и доктор химических наук, Наталья Григорьевна Базарнова (профессор, заведующий кафедрой органической химии, института химии и химико-фармацевтических технологий, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный университет») дали положительные отзывы.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» - в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа Назаровой Н.Б., посвященная оптимизации процесса получения бактериальной целлюлозы, и получению на её основе биокомпозиционных 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, Назарова Н.Б., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии и биотехнологии.

Так, доктор биологических наук Громовых Татьяна Ильинична известна своими исследованиями в области образования биопрепаратов (бактериальной целлюлозы, экзополисахаридов и др.). Доктор химических наук Базарнова Наталья Григорьевна известна своими работами в области исследования переработки растительного сырья и исследования свойств 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 4 статьях 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. Богатырева А.О., Сапунова Н.Б.*, Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальных экзополисахаридов на средах с отходами // Вестник технологического университета. – 2016. – Т. 19. – № 24. – С.142-145.
2. Melnikova N., Knyazev A., Nikolskiy V., Peretyagin P., Belyaeva K., **Nazarova N.***, Liyaskina E., Malygina D., Revin V. Wound healing composite materials of bacterial cellulose and zinc oxide nanoparticles with immobilized betulin diphosphate // *Nanomaterials*. – 2021. – 11(3). – 713; <https://doi.org/10.3390/nano11030713>.
3. Revin V.V., Dolganov A.V., Liyaskina E.V., **Nazarova N.B.***, Balandina A.V., Devyataeva A.A., Revin V.D. Characterizing bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter sucrofermentans* H-110 on molasses medium and obtaining a biocomposite based on it for the adsorption of fluoride // *Polymers*. – 2021. – 13(9). – 1422; <https://doi.org/10.3390/polym13091422>.
4. Revin V.V., **Nazarova N.B.***, Tsareva E.E., Liyaskina E.V., Revin V.D., Pestov N.A. Production of bacterial cellulose aerogels with improved physico-mechanical properties and antibacterial effect // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – 8. – 603407. doi: 10.3389/fbioe.2020.603407.

По результатам работы было получено 2 патента:

1. Патент № 2681281, Российская Федерация. Штамм бактерии *Komagataeibacter hansenii* – продуцент бактериальной целлюлозы / Ревин В.В., Сапунова Н.Б.*, Лияськина Е.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (RU) – опубл. 05.03.2019.
2. Патент № 2736061, Российская Федерация. Способ получения биокompозита на основе аэрогеля бактериальной целлюлозы, обладающего кровоостанавливающими свойствами / Ревин В.В., Лияськина Е.В., **Назарова Н.Б.***, Саликов А.В., Федоров И.Г.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (RU) – опубл. 11.11.2020.

*Сапунова =Назарова=Sapunova=Nazarova

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: 1) 69-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского Институт биологии и биомедицины (Нижний Новгород, 2016); 2) XV Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2016); 3) European Biotechnology Congress 2019, 2020. 4) ежегодной научной конференции «Огарёвские чтения» в Национальном исследовательском Мордовском государственном университете им. Н.П. Огарёва, Саранск, 2015-2017; научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва, Саранск, 2015-2016;

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Т.И. Громовых, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- 1) На стр. 85 автор пишет: «... полученным инокулятом, в количестве 10% от среды заседали опытные колбы, содержащие 100 мл питательной среды...». Однако автор не отмечает, какой титр клеток содержится в этом инокуляте при 10% от среды? Как его определяли и дозировали для всех вариантов при посевах?
- 2) Не указано также при каком режиме перемешивания проводили глубинное культивирование штаммов?
- 3) Неясно, какой критерий отбора стандартных штаммов из ВКПМ служил основанием для их использования в работе?
- 4) Как автор может пояснить выбор штамма *Komagataeibacter hansenii* В-12950 для исследований?
- 5) Как контролировали полное освобождение синтезируемого полимера от клеток после отмывания?
- 6) Не приводится описание тест-штаммов для оценки антимикробной активности и метод ее оценки. Неясно, какие размеры были у дисков при испытаниях и что послужило контролем для сравнительной оценки?

Отзыв официального оппонента доктора химических наук Н.Г. Базарновой, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. В диссертации в качестве одной из задач указано выделение штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы, однако в самой работе приводятся сведения о выделении лишь одного штамма *Komagataeibacter hansenii*. При этом, сравнительный анализ этого штамма с коллекционными приводит соискателя к неожиданному заключению, что коллекционный штамм (*K. sucrofermentans* В-11267) лучше, т.к. у него выход и характеристики бактериальной целлюлозы выше. Однако, это показано лишь в случае статического культивирования на среде с бардой и динамического культивирования на среде HS, при этом индекс кристалличности БЦ, синтезированной этими штаммами, во многих вариантах близок.
2. Приведены данные по динамике образования БЦ при культивировании штаммов продуцентов в динамических и статических условиях культивирования на разных средах. Однако, для динамических условий представлены данные до 3-х суток культивирования, в то время как по статическим указан выход БЦ на 5 сутки. Возникает вопрос, почему сравниваются эти данные при разной продолжительности культивирования и что происходит с культурой и синтезом БЦ в динамических и статических условиях после истечения этого времени.
3. Не приведены данные по статистической обработке результатов в ряде таблиц и на рисунках (например, в таблицах 7, 8, 9 и на рисунках 45, 46, 47).
4. При анализе антибактериальных свойств полученных композитов не представлены данные по контрольному варианту (без включения фузидовой кислоты). В то же время известно, что хитозан также обладает антибактериальной активностью.
5. При описании собственных результатов соискатель использовал недостаточно ссылок на публикации других исследователей.

Отзыв ведущей организации Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» – отзыв положительный. Замечания:

1. При описании продукции бактериальной целлюлозы штаммом *K. hansenii* В-12950 (раздел 3.1. стр 99) было бы не лишним включить в текст объяснение выбора продолжительности выращивания культуры в статических и динамических (5 и 3 суток) условиях, и правомерность сравнения выходов бактериальной целлюлозы, учитывая эти различия.
2. Не совсем понятно, с какой целью информация, представленная в таблице 4, дублирована в графической форме на рисунке 33.
3. Бесспорно, что состав жирных кислот является важным хемотаксономическим критерием, но с какой целью он исследовался для уже идентифицированных до вида бактерий продуцентов БЦ из коллекции и вновь изолированного штамма?
4. Учитывая большой объем проведенной работы, ее приоритетность, не ясно, почему автор не упомянул в выводе 2 выполненную оптимизацию продукции бактериальной целлюлозы по целому ряду значимых параметров для каждого из исследуемых штаммов бактерий продуцентов.
5. Из оформительских неточностей: на фотографиях рис. 36 не обозначено увеличение, в диссертации встречаются не выправленные опечатки, неудачные выражения, например, «наиболее оптимальный» и др.

На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:

1. Воденев В.А. – д.б.н., доцент, заведующий кафедрой биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского». Замечаний нет.
2. Мельникова Н.Б. – д.х.н., профессор кафедры аналитической и медицинской химии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского». Замечания и вопросы:
 - а. Желательно было обосновать кровеостанавливающие свойства полученного материала, например, провести исследования на коагуляционную активность, на свертываемость крови, а не связывать эти свойства с бактериальной и влагоудерживающей способностью
 - б. Степень кристалличности, вероятно, была оценена по данным порошковой рентгенофазовой дифрактометрии, а не по данным рентгеноструктурного анализа (стр. 5).
3. Митрошина Е.В. – к.б.н., доцент кафедры нейротехнологии Института биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского». Замечаний нет.
4. Волова Т.Г. – д.б.н., профессор, заведующий базовой кафедрой биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», и Прудникова С.В. – д.б.н., профессор базовой кафедрой биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет». Замечаний нет.
5. Воронова М.И. – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории "Физическая химия гетерогенных систем полимер-жидкость" ФГБУН Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН. Замечания и вопросы:

- a. В автореферате (и в диссертации тоже) нет характеристик хитозана (молекулярная масса), использованного для получения композита БЦ/хитозан.
 - b. Есть ли различия в антибактериальных свойствах аэрогеля БЦ/хитозан/фузидовая кислота и гидрогеля БЦ/хитозан/фузидовая кислота (в работе Богатыревой А.О.)?
 - c. стр.14 «...все исследуемые аэрогели представлены микропористыми структурами, что справедливо для всех видов лиофилизированных аэрогелей. Однако размер пор аэрогелей различный. Наименьший размер пор наблюдается у аэрогелей, полученных на основе БЦ (рис. 12А)». Наличие микропор (диаметр менее 2 нм) нельзя определить визуально по СЭМ-изображениям с масштабом 200-500 мкм. Микропористый сорбент или нет, можно определить по данным низкотемпературной адсорбции азота.
 - d. Неясно, какая дополнительная информация о структуре композитов получена из данных компьютерной томографии. На рис. 13 нет масштаба
 - e. стр. 14. «Проанализировав полученные результаты, мы пришли к выводу, что наиболее оптимальным по способу получения и физико-механическим характеристикам является композит на основе бактериальной целлюлозы и хитозана в соотношении 80:20». Неясно, о каких физико-механических характеристиках идет речь. Кроме пористости, других характеристик не приводится;
 - f. стр. 17. «нами был получен сорбент на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы путем нанесения на ее поверхность оксида алюминия толщиной 50 нм с помощью ALD-технологии». Неясно, в каком виде БЦ использовалась в качестве основы для нанесения пленки Al_2O_3 . Гель-пленки? Высушенной гель-пленки? Каким образом высушенной? Какова морфология поверхности БЦ?
 - g. Влияет ли морфология, пористость поверхности пленки БЦ на адсорбционную способность Al_2O_3 ? Если не влияет, то в чем смысл использования именно БЦ?
 - h. Не описана установка (в диссертации), на которой осуществлялся процесс нанесения пленки Al_2O_3 на БЦ;
 - i. Неясно, какой реактив использовался для получения раствора фторид-ионов?
 - j. Неясно, на каких образцах БЦ/ Al_2O_3 получены зависимости адсорбционной емкости от pH (рис. 16) и от времени (рис. 17), так как максимальные значения емкости из этих графиков примерно 40 мг/г и 8 мг/г, а для образцов 1 (толщина слоя Al_2O_3 100 нм) и 2 (толщина слоя Al_2O_3 50 нм) по графику 15 составляют -70 и 80 мг/г.
 - k. стр. 19. «Получены изотермы сорбции фторид-ионов образцами 1 и 2. В обоих случаях они соответствовали изотермам модели Ленгмюра». В автореферате (и в диссертации тоже) не приведены изотермы (зависимость величины сорбции от равновесной концентрации) сорбции фторид-иона композитами БЦ/ Al_2O_3 .
6. Ефременко Е.Н. – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией экобиокатализа кафедры химической энзимологии химического ф-та ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова». Замечания и вопросы:
- a. По оформлению - в автореферате не отражен личный вклад автора и не выделены положения, выносимые на защиту, хотя требования к оформлению требуют присутствия этой информации;
 - b. На рис. 2, 6, 7, 8 концентрация накапливаемой БЦ представлена в г/л, при этом не понятно это г по сухому или влажному весу.
 - c. При определении содержания жирных кислот биомассы штаммов продуцентов БЦ не указано, на какой среде была получена биомасса для этого анализа. Отсутствуют статистические данные (доверительные интервалы) в таблице 1;
 - d. При исследовании сорбционной емкости полученного сорбента на основе БЦ и оксида алюминия не хватает данных непосредственно, полученных по сорбционной емкости самой чистой БЦ, которые могли бы быть использованы в качестве контроля. При этом для демонстрации преимуществ полученного в работе сорбента, вероятно, целесообразно было бы представить сравнение характеристик такого композиционного материала с ранее известными сорбентами на основе БЦ и Al_2O_3 , полученными другими исследователями.

7. Кленова Н.А. – д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С.П. Королева». Замечание/вопрос: в автореферате отсутствует точное описание состава среды культивирования, содержащей мелассу или барду, есть ли там еще какие-нибудь компоненты?
8. Максимов Г.В. – д.б.н., профессор кафедры биофизики биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова». Замечаний нет.
9. Сеницын А.П. – д.х.н., профессор, заведующий лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», заведующий лабораторией биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН. Замечаний нет.
10. Лобастова Т.Г. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории микробиологической трансформации органических соединений ИБФМ РАН, обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН. Замечания и вопросы:
 - a. В разделе «Материалы и методы...» не указана концентрация мелассы и барды в жидкой среде при проведении экспериментов;
 - b. В разделе «Материалы и методы...» не отмечено, через какой интервал времени и какое количество пассажей было сделано при многократных пересевах для выделения новых штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы;
 - c. В п. «Глава 3. Результаты и обсуждения» допущена опечатка – следует писать «Глава 3. Результаты и обсуждение»;
 - d. В пункте «Сравнительная характеристика штаммов продуцентов...», стр. 6, 1 абзац указано, что «... на структуру бактериальной целлюлозы и выход полимера могут влиять несколько факторов, включая типы штаммов бактерий, продуцирующих БЦ...». Словосочетание «типы штаммов бактерий» используется некорректно.
 - e. В подписях к рисункам 4 и 12 желательнее указать метод используемой микроскопии;
 - f. На стр. 14, во 2 абзаце указано «рис. 24», хотя общее количество рисунков 18.

Все отзывы положительные.

Вопросы задавали: д.б.н. Плакунов В.К., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Летаров А.В., д.б.н. Складнев Д.А., д.б.н. Равин Н.В., д.б.н. Терешина В.М., д.б.н. Варламов В.П., д.б.н. Пименов Н.В.

В дискуссии приняли участие: д.б.н. Плакунов В.К., д.б.н. Летаров А.В., д.б.н. Пименов Н.В.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Назаровой Н.Б., посвященная оптимизации условий культивирования штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы, и получению биокомпозиционных материалов функционального назначения на ее основе является завершенной научно-квалификационной работой.

В ходе выполнения работы впервые из индийского риса был выделен новый штамм продуцент бактериальной целлюлозы *Komagataeibacter hansenii* В-12950, отличающийся стабильностью в отношении образования целевого продукта.

Изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства существующих на кафедре штаммов продуцентов БЦ *K. sacrofermentans* В-11267, *K. xylinus* В-12429, *K. xylinus* В-12430 и *K. hansenii* В-12950. Установлено, что наибольшим

выходом БЦ с необходимыми характеристиками обладает штамм *K. sacrofermentans* В-11267.

Впервые получены аэрогели на основе бактериальной целлюлозы, хитозана и фузидина натрия, обладающие антибактериальной активностью. Полученные материалы могут быть использованы в медицине в качестве кровоостанавливающего материала благодаря своей высокой водоудерживающей способности, высокой пористости, антибактериальной активности.

Впервые получены адсорбенты на основе бактериальной целлюлозы с нанесением на ее поверхность нанослоя оксида алюминия толщиной 50 нм, обладающие высокой адсорбционной способностью по отношению к ионам фтора. Максимальная адсорбционная способность композита составляет 80,1 мг/г (F/композит).

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что в ходе работы были изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы из коллекции кафедры биотехнологии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева. В ходе работы показано влияние условий культивирования на физико-химические свойства полимера. Получены биокомпозиционные материалы на основе бактериальной целлюлозы функционального назначения.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что выделенный штамм продуцент можно использовать для получения бактериальной целлюлозы. Показана возможность применения БЦ для получения биокомпозиционных материалов в форме аэрогелей для возможного использования в качестве гемостатических материалов нового поколения, а также для получения сорбентов ионов фтора.

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 15 печатных работ, в числе которых 1 статья в российском научном журнале, рекомендованном ВАК, 3 статьи в иностранных научных журналах, входящих в реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science, Scopus, 2 патента РФ, монография, а также тезисы российских и международных конференций. 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.

