

Отзыв

официального оппонента на диссертацию 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», представленную

к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

1. Актуальность темы диссертации

Рассматриваемая диссертационная работа Назаровой Натальи Борисовны посвящена актуальной теме – поиску и выделению новых целлюлозосинтезирующих штаммов, исследованию условий биосинтеза бактериальной целлюлозы и созданию на её основе функциональных материалов различного назначения. Десятилетний опыт исследования и определённые достижения в области изучения биополимеров продемонстрировали важность и потенциал использования данных материалов в различных сферах жизнедеятельности человека.

Бактериальная целлюлоза – это природный биополимер, имеющий важное значение в различных сферах человеческой деятельности благодаря своим невероятным физико-химическим и биологическим свойствам. Этот полисахарид демонстрирует высокую площадь поверхности, механическую прочность, биоразлагаемость. Бактериальная целлюлоза значительно превосходит свой аналог растительного происхождения благодаря своей высокой чистоте, кристалличности, наноструктуре, высокой степени полимеризации.

Несмотря на то, что бактериальная целлюлоза – это продукт с большим коммерческим потенциалом, ее широкое использование затруднено из-за высоких производственных затрат. Медленный синтез целлюлозы бактериальными клетками является одной из причин высокой себестоимости данного полимера и может быть связан с низкой скоростью роста бактерий, продуцирующих целлюлозу, а также низкой скоростью кристаллизации целлюлозы клетками. Еще одной причиной высокой себестоимости бактериальной целлюлозы является использование для ее синтеза дорогих питательных сред. С целью удешевления процесса биосинтеза бактериальной целлюлозы многие исследователи в настоящее время предлагают использовать среды, состоящие из отходов различных производств. Одновременно решается вопрос, связанный с их утилизацией. В связи с выше изложенным, тема диссертационной работы Натальи Борисовны Назаровой актуальна и значима.

2. Достоверность и научная новизна результатов и выводов

Достоверность полученных результатов подтверждается значительным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием современных физико-химических, микробиологических, молекулярно-генетических биохимических аналитических и лабораторно-клинических методов исследования, а также статистической обработкой результатов.

Практическая значимость заключается в выделении нового штамма продуцента бактериальной целлюлозы, проведении сравнительной характеристика коллекционных штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы, а также в

создании абсолютно новых функциональных материалов: аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы, хитозана и фузицина натрия, обладающих антибактериальной активностью, и адсорбентов на основе бактериальной целлюлозы с нанесением на ее поверхность нанослоя оксида алюминия толщиной 50 нм, обладающих высокой адсорбционной способностью по отношению к ионам фтора.

3. Практическая и научная значимость состоит в выделении и последующем депонировании нового штамма продуцента бактериальной целлюлозы, который может быть использован в фундаментальных и прикладных исследованиях. Разработан способ получения аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы, хитозана и фузидовой кислоты, которые могут быть использованы при создании гемостатических материалов с антибактериальными свойствами. Впервые получен эффективный адсорбент нового поколения на основе бактериальной целлюлозы, обладающий высокой селективностью по отношению к ионам фтора.

4. Содержание диссертации

Диссертация Н.Б. Назаровой написана четким, понятным языком, аккуратно оформлена ее структура логична и подчинена выбранному автором направлению исследований. Работа изложена на 162 страницах компьютерного текста, включает 10 таблиц, 56 рисунков, список литературы из 162 наименований, из них 18 на русском и 144 на английском языке. Структура диссертационной работы традиционная: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и трёх приложений.

Введение содержит обоснование актуальности выбранного направления исследований, обозначена проблема получения биоразлагаемых полимеров, синтезируемых микроорганизмами. Охарактеризованы причины отсутствия производства ценного экзополисахарида бактериальной целлюлозы отсутствием продуктивных штаммов и подбором дешевых субстратов для промышленного производства. Во введении четко сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

В **Обзоре литературы**, изложенном на 72 страницах, подробно освещены мировые исследования авторов последних лет по характеристике полимера бактериальная целлюлоза, способам получения на различных источниках углерода. Достаточно объемный анализ дан композитам, полученным как на основе бактериальной целлюлозы, так и на основе других полимеров для использования их в различных направлениях. Особое внимание автор диссертационной работы в этом разделе посвящает гидро- и аэрогелям, используемым в медицине. Однако, такая информация в конкретной научной работе является излишней, поскольку посвящена общим вопросам применения этих материалов в медицине, а не конкретным исследованиям по теме диссертации. В обзоре также представлены сведения о химических соединениях и материалах, используемых для разработки композитов на основе бактериальной целлюлозы.

Глава **Объекты и методы** посвящена описанию основных объектов, используемых в работе. При выполнении исследований автором диссертационной работы использованы штаммы-продуценты биополимера бактериальная целлюлоза, близкие по таксономическому положению *Komagataeibacter*

sucrofermentans В-11267, *Komagataeibacter xylinus* В-12429, *Komagataeibacter xylinus* В-12430 и *Komagataeibacter hansenii* В-12950. Два из этих штамма были получены из Биоресурсного центра - Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ), и исследовались автором в сравнительном аспекте.

В тексте главы дается подробное описание методов культивирования в стационарном и в режиме перемешивания. Полученные пленки и глобулы бактериальной целлюлозы в результате этого культивирования автором диссертационной работы были источником для дальнейших исследований получения композитов. При выполнении этой части исследований автор диссертационной работы использовала микробиологические, микроскопические, биотехнологические, биохимические и физико-химические методы исследования. Все эти методы позволили ей идентифицировать выделенный новый штамм и провести оценку его продуктивности в сравнении с другими штаммами-продуцентами бактериальной целлюлозы. Для определения индекса и степени кристалличности полученного полимера бактериальной целлюлозы использованы методы рентгеноструктурного анализа, ИК-спектрометрии; определение влагосвязывающей и гемоагуляционной способности, пористости проведено с использованием современных лабораторных методов и статистической обработки полученных результатов с использованием компьютерных программ.

Подробно приводится описание получения композитов целлюлозы с хитозаном в условиях *ex situ* и *in situ*. Использование современных методов получения и исследования свойств композитов, позволили автору диссертационной работы дать им характеристику и сделать достоверные научные обобщения и рекомендации.

В качестве замечаний к этой главе следует отметить:

- 1) На стр. 85 автор пишет: «... Полученным инокулятом, в количестве 10 % от среды засеивали 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 контролировали полное освобождение синтезируемого полимера от клеток после отмывания?
- 5) 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?

Глава **Результаты исследований** начинается с описания источника выделения и способов скрининга штаммов-продуцентов бактериальной целлюлозы. Автор показала, что в результате многоступенчатого скрининга из нескольких изолятов был выделен новый штамм *Komagataeibacter hansenii* В-12950, способный расти на среде с мелассой, синтезируя бактериальную целлюлозу с высокой степенью кристалличности 83 %, что выше, чем для целлюлозы, синтезируемой другими исследуемыми штаммами.

Автор убедительно показала преимущество использования нового штамма в виду присущих ему свойств высокой продуктивности, способности расти на различных источниках углерода, в том числе на промышленных отходах (мелассе).

Безупречными результатами являются представленные в работе показатели продуктивности исследуемых штаммов при различных значениях рН среды, источниках углеродного и азотного питания. Автором убедительно показаны различия в продуктивности и степени кристалличности получаемого полимера при культивировании на средах с различными источниками углерода и азота и режиме культивирования. В результате этого этапа исследований автор приходит к выводу, что: «...наибольшим выходом БЦ обладает штамм *K. sacrofermentans* В-11267. Кроме того, образуемый данным штаммом полимер обладает наилучшими характеристиками для его дальнейшего использования в качестве материала для создания биокompозитов функционального назначения...». Однако, в качестве новизны полученных результатов автор обозначила, что получен новый штамм *Komagataeibacter hansenii* В-12950, который рекомендуется для дальнейшего использования в экспериментальных исследованиях и для получения целлюлозы. Как это автор может пояснить?

В качестве последнего этапа в работе приводятся результаты по получению биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы и изучению их свойств. Главному компоненту для получения композита хитозану автор уделяет значительное внимание. В различных условиях получены композиты бактериальной целлюлозы и хитозана, которые автор в дальнейшем рекомендует для использования в медицине. Автор приводит результаты проведенной оценки влагосвязывающей способности композитов, полученных в разных условиях, и делает вывод о том, что все образцы композитов проявляют хорошие сорбционные свойства.

На основании исследования свойств композитов бактериальной целлюлозы и хитозана автор диссертационной работы Н.Б. Назарова доказывает целесообразность технологии создания в определенных соотношениях компонентов: композит на основе бактериальной целлюлозы, полученной в динамических условиях, смешанной с 2 % раствором хитозана в соотношении 50:50; композит на основе бактериальной целлюлозы, полученной в статических условиях, смешанной с 2 % раствором хитозана в соотношении 50:50 и композит на основе бактериальной целлюлозы, полученной в статических условиях, смешанной с 2 % раствором хитозана в соотношении 80:20. При этом автор на основании дальнейших анализов композитов приходит к выводу, что наилучшим для дальнейшего использования является композит №3.

В разделе 3.3.1.3 «Получение композитов в форме аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана с фузидовой кислотой» автор диссертационной работы показала перспективность использования композитов в качестве покровных материалов. Уникальным и новым аспектом, позволяющим повысить антимикробную активность композитов на основе бактериальной целлюлозы и хитозана, автор убедительно показывает получение трехкомпонентного композита, вводя фузидовую кислоту в состав. С использованием тестовых штаммов *S. aureus* 209 Р и *B. licheniformis* автор показывает наличие антимикробной активности у полученного композита.

Завершающие исследования приводятся при описании полученных результатов в разделе «3.3.2 Получение сорбентов ионов фтора на основе

бактериальной целлюлозы», в котором дано новое направления использования композитов бактериальной целлюлозы. Автором диссертационной работы получен сорбент на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы путем нанесения на ее поверхность оксида алюминия толщиной 50 нм с помощью ALD-технологии.

В Заключении автор дает обобщение выполненным исследованиям, акцентируя внимание на отсутствие в Российской Федерации биотехнологии производства бактериальной целлюлозы в виду низкой продуктивности имеющихся штаммов-продуцентов и высокой перспективности разработки технологии получения композитов на её основе.

Выводы полностью основаны на результатах собственных исследований автора Назаровой Натальи Борисовны и отражают основные результаты диссертационной работы, ее научную, теоретическую и практическую значимость.

Текст диссертации завершается списком литературы, в котором имеется 18 русскоязычных работ и 144 на иностранных языках.

5. Опубликование результатов диссертации в печати

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в числе которых 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 конференций. Публикации достаточно полно отражают основные результаты, полученные в работе.

Однако при общей, несомненно, положительной оценке диссертации указанные недостатки не имеют принципиального характера и не снижают высокого уровня научной новизны, теоретической и практической значимости выполненной работы.

6. Содержание автореферата

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Министерства науки и образования РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации. Замечания отсутствуют.

Заключение

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», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология, является завершенной научно-квалификационной работой, которая направлена на выделение новых синтезирующих целлюлозу штаммов, исследование условий их культивирования и создание на основе бактериальной целлюлозы функциональных материалов различного назначения.

Все вышеуказанное соответствует критериям, которым должна отвечать диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, изложенным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24.09.13 № 842, а автор – Назарова Наталья Борисовна

