

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук, созданного на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», по диссертации Лучниковой Натальи Алексеевны «Трансформация пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда с использованием актиномицетов рода *Rhodococcus*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Решение диссертационного совета от 15 декабря 2023 г. №13 о присуждении Лучниковой Наталье Алексеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Лучниковой Натальи Алексеевны «Трансформация пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда с использованием актиномицетов рода *Rhodococcus*» по специальности – 1.5.11. – Микробиология принята к защите 13 октября 2023 г. протокол №11 диссертационным советом 24.1.233.02, созданным 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. (с учетом переименования Совета от 03.06.2021 г. №561/нк, с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 12.10.2022 г. №1162/нк).

Соискатель Лучникова Наталья Алексеевна, 03 ноября 1994 года рождения, гражданка РФ, в 2016 г. окончила бакалавриат по направлению 05.03.06 Экология и природопользование, в 2018 г. с отличием окончила магистратуру биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета по направлению 06.04.01 Биология и получила квалификацию магистр. В период 2018-2022 гг. Лучникова Н.А. проходила обучение в очной аспирантуре на кафедре микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета. С декабря 2022 г по настоящее время работает на кафедре микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета в качестве ассистента, а также является ведущим инженером лаборатории алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь.

Диссертационная работа Лучниковой Натальи Алексеевны «Трансформация пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда с использованием актиномицетов рода *Rhodococcus*» выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета и лаборатории алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор, академик РАН Ившина Ирина Борисовна, зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет».

Официальные оппоненты: Несчисляев Валерий Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии, начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала АО «НПО Микроген» в г. Перми Пермское НПО «Биомед» и Михайлов Валерий Викторович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, куратор Коллекции морских микроорганизмов, зав. лабораторией микробиологии Тихоокеанского института биоорганической химии имени Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» - в своем положительном отзыве указала, что диссертационная работа Лучниковой Натальи Алексеевны «Трансформация пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда с использованием актиномицетов рода *Rhodococcus*» является завершенной научно-квалификационной работой. Диссертационная работа соответствует п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а сама автор, Лучникова Н.А., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии. Так, доктор медицинских наук Несчисляев Валерий Александрович известен своими исследованиями в области изучения влияния мета-, анти- и пробиотиков, различных активных веществ на физиологию микроорганизмов. Доктор биологических наук Михайлов Валерий Викторович является

специалистом в области таксономии прокариот, изучении их биотехнологического потенциала. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого количества публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области таксономии и физиологии микроорганизмов, 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. **Luchnikova N.A.**, Grishko V.V., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanane and ursanetriterpenic acids // *Molecules*. – 2020. – V. 25, No. 23. – 5526. DOI: 10.3390/molecules25235526.
2. **Luchnikova N.A.**, Grishko V.V., Kostrikina N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanolic acid using *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 757 // *Catalysts*. – 2022. – V. 12, No. 11. – 1352. DOI: 10.3390/catal12111352.
3. **Лучникова Н.А.**, Тарасова Е.В., Гришко В.В., Ившина И.Б. *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360 – эффективный биокатализатор С3 окислительной трансформации олеанановых тритерпеноидов // *Микробиология*. – 2023. – Т. 92, № 2. – С. 184–196. DOI: 10.31857/S0026365622600742.
4. Tarasova E.V., **Luchnikova N.A.**, Grishko V.V., Ivshina I.B. Actinomycetes as producers of biologically active terpenoids: Current trends and patents // *Pharmaceuticals*. – 2023. – V. 16, No. 6. – 872. DOI:10.3390/ph16060872.

Патент: Лучникова Н.А., Гришко В.В., Ившина И.Б. Способ получения 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты с использованием клеток *Rhodococcus rhodochrous*. Заявка № 2023111046 от 28.04.2023 на получение патента РФ.

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: World Summit on Catalysis Engineering and Technology (CatET-2019, Valencia, Spain, 2019); XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия» (Пермь, 2019); VIII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020); Всероссийской междисциплинарной молодежной научной конференции с международным участием «IX Информационная школа молодого ученого» (Екатеринбург, 2021); Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» (Пермь, 2021); Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов» (Владивосток, 2022).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Михайлова Валерия Викторовича, (положительный). Принципиальных замечаний нет, имеются неточности:

1. На стр. 13 упомянуто растение *Meconopsis henrici* и дан перевод меконописис Генри, а надо меконописис Анри, так как это растение названо в честь принца Анри Орлеанского.
2. Стр. 61 – Подзаголовок 2.1. Рабочая коллекция. Здесь (и далее по тексту диссертации) названия видов бактерий *Glutamicibacter nikotianae* и *Rhodococcus qingshengii* написаны с ошибкой в видовых эпитетах (в автореферате *Rhodococcus qingshengii* написано правильно).
3. На стр. 89 и далее по тексту в качестве тест-культуры значится штамм *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Между тем, в этой коллекции под этим номером хранится *Bacillus spizizenii*.

Отзыв официального оппонента доктора медицинских наук Несчисляева Валерия Александровича, (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы:

- 1) Почему количественный анализ олеаноловой и глицерретовой кислот проводился разными методами: ВЭЖХ и ГХ-МС?
- 2) При обсуждении результатов было бы целесообразно пояснить, чем обусловлен выбор 148 штаммов для скрининга трансформирующей активности. Обладают ли бактерии штаммов, способных к биотрансформации тритерпеновых кислот, общими характеристиками? Согласно полученным данным, возможно ли прогнозировать присутствие бактерий а аналогичными свойствами в той или иной экологической нише?
- 3) Антибактериальные эффекты тритерпеновых кислот и продуктов их биотрансформации, выявленные в опытах *in vitro*, проявляются лишь при высоких значениях МПК в отношении тест-бактерий. По вашему мнению, можно ли рекомендовать эти соединения для более глубоких исследований их антимикробного потенциала?

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» – отзыв положительный. Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Имеется вопрос:

1. По мнению диссертанта, не усложнит ли биотехнологический процесс получения целевых биоактивных производных выявленная способность бактериальных трансформаторов к выраженной агрегации клеток в присутствии тритерпеноидов?

На автореферат поступили следующие положительные отзывы. Отзывы прислали:

1. Архипченко И.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. Замечаний нет.

2. Волова Т.Г., д.б.н., профессор, заведующий базовой кафедрой биотехнологии, и Прудникова С.В., д.б.н., профессор базовой кафедры биотехнологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Институт фундаментальной биологии и биотехнологии. Замечаний нет.
3. Зеленихин П.В., к.б.н., доцент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Замечание: «К сожалению, представленный автореферат оставляет неясность в вопросе о том, тестировалась ли цитотоксичность производных олеаноловой и глицирретовой кислот *in vitro*. В списке методов указание на это присутствует, в разделах «Положения...», «Результаты...» и «Выводы» упоминаний о подобных исследованиях нет».
4. Козлов А.В., д.б.н., доцент, заведующий кафедрой микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Замечаний нет.
5. Немцева Н.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинских технологий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН. Замечаний нет.
6. Соловых Г.Н., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ. Замечаний нет.
7. Фокина В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Замечаний нет.
8. Худокормов А.А., к.б.н., заведующий кафедрой генетики, микробиологии и биохимии ФГБОУ ВО «КубГУ». Замечаний нет.
9. Шеховцова Н.В., к.б.н., доцент, заведующий кафедрой ботаники и микробиологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова». Замечаний нет.
10. Карначук О.В., д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Томского государственного университета. Замечаний нет.
11. Мязин В.А., к.б.н., заведующий лабораторией экологии микроорганизмов, Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение ФИЦ «Кольский научный центр Российской академии наук». Имеются вопросы:
 - а. Стр. 8. Почему разделение продуктов биотрансформации олеаноловой кислоты клетками различных штаммов *Rhodococcus rhodochrous* проводили разными методами?
 - б. Стр. 9. Был ли отмечен токсический эффект олеаноловой кислоты в отношении клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360 на стадии скрининга? Если да, то по каким критериям данный штамм был отобран для дальнейших исследований?
12. Щемелинина Т.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Замечаний нет.

Все отзывы положительные.

Вопросы задавали: д.б.н. Слободкин А.И., д.б.н. Летаров А.В., д.х.н. Мирошников К.А., д.б.н. Равин Н.В., д.б.н. Щербакова В.А., д.б.н. Пименов Н.В.

В дискуссии приняли участие: д.б.н. Назина Т.Н., д.б.н. Пименов Н.В.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Лучниковой Н.А., посвященная исследованию способности актиномицетов к окислительной трансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда, является завершенной научно-квалификационной работой.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые показана способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к биотрансформации растительных пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда – олеаноловой и глицирретовой кислот. Получены 3-оксопроизводные производные ОК и ГК. Впервые показано, что *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 способен осуществлять новые реакции C5 гидроксирования и C23 карбоксилирования молекулы ОК с образованием ранее неопisanного полиоксигенированного метаболита – 3 β ,5 α ,22 α -тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовой (5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой) кислоты. С использованием биоинформатического анализа результатов NGS-секвенирования штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* выявлены гены, ответственные за образование мембранно-связанных ферментов семейства CYP450, участвующих в процессе биоконверсии тритерпеноидов. Составленный каталог генов, кодирующих ферменты окислительной трансформации ОК и ГК, может быть использован для поиска целевых генов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что с использованием суспензий нерастущих клеток *R. rhodochrous* достигнута полная биоконверсия ОК и ГК в высоких (1,0 г/л) концентрациях. По данным *in silico* анализа, полученные оксопроизводные обладают пониженной токсичностью по сравнению с исходными кислотами и перспективны в качестве потенциальных противоопухолевых, антиоксидантных и противовоспалительных агентов. *In vitro* показана антибактериальная активность 3-оксо-ОК и 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты. Штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 по форме “патентное депонирование” переданы во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номерами Ас-2189 и Ас-2191 соответственно. Подана заявка № 2023111046 от 28.04.2023 на выдачу патента РФ “Способ получения 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты с использованием клеток *Rhodococcus rhodochrous*”.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что полученные результаты являются воспроизводимыми и достоверными, а выводы – обоснованными, что подтверждается современными методами исследования и статистической обработкой результатов. При выполнении диссертационной работы был применен комплексный подход с использованием микробиологических, физико-химических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов. Степень достоверности также подтверждается опубликованными по теме работы статьями в ведущих, рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах.

По теме диссертации подана одна заявка на патент и опубликовано 10 печатных работ, из которых 4 статьи, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus, и

6 тезисов научных конференций различного уровня. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, анализе полученных данных и представлении их научной общественности на конференциях и в виде экспериментальных статей.

Заключение.

Диссертация **Лучниковой Натальи Алексеевны «Трансформация пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда с использованием актиномицетов рода *Rhodococcus*»** является законченной научно-квалификационной работой. Полученные автором результаты имеют существенное значение для расшифровки процессов биотрансформации пентациклических тритерпеноидов и решения связанных с этим прикладных задач.

Работа соответствует профилю Диссовета 24.1.233.02 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 15 декабря 2023 г. Диссертационный совет принял решение присудить **Лучниковой Наталье Алексеевне** ученую степень кандидата биологических наук по специальности – 1.5.11. – Микробиология.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 17 чел., из них 9 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 17, «против» - 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета 24.1.233.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук

Н.В. Пименов

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук



Т.В. Хижняк

15 декабря 2023 г.