

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Сулейманова Руслана Закиевича

«Поиск и метаболическая инженерия новых метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

### **Актуальность исследования.**

Аэробные метанооксиляющие бактерии (метанотрофы) обладают уникальной способностью расти на метане как на единственном источнике углерода и энергии. Они повсеместно распространены в окружающей среде и играют важную роль в снижении эмиссии парникового газа метана в атмосферу.

Помимо своей важности в глобальном цикле метана, аэробные метанотрофные бактерии уже давно представляют значительный биотехнологический интерес.

Проведенный на сегодняшний день тщательный пересмотр основных метаболических путей и доступность метаболических моделей открывают широкие возможности для метаболической инженерии метанотрофных бактерий и расширяют потенциал их биотехнологических применений.

Показано, что микробный белок является хорошим источником белка для корма животных. Несколько микроорганизмов могут использоваться в качестве продуцентов кормового белка, но на их фоне метанотрофы являются лучшими кандидатами, поскольку они, как правило, имеют более высокое содержание белка (до 80% от сухого веса клетки) по сравнению с дрожжами и грибами, а также лучшую усвояемость, чем водоросли. Их благоприятный аминокислотный профиль также делает их подходящими ингредиентами для корма рыб, свиней и кур среди других.

Метанотрофы обладают огромным потенциалом для смягчения последствий изменения климата, одновременно производя ценные продукты. Чтобы достичь этого в коммерческих масштабах, необходимо решить ряд задач, таких как оптимизация штаммов, используемых для биосинтеза конкретных продуктов, а также оптимизация технологии ферментации, которая будет поддерживать рост штаммов в больших масштабах. Разработка хороших технологий ферментации имеет решающее значение для коммерческого успеха любого биотехнологического продукта.

Исходя из вышесказанного диссертация Сулейманова Руслана Закиевича, посвященная поиску новых природных быстрорастущих штаммов метанотрофных бактерий, как продуцентов кормового белка на основе метана для аквакультуры, а также оптимизации их метаболизма с помощью подходов геномной инженерии, следует бесспорно признать актуальной.

**Обоснованность и достоверность полученных результатов.** В ходе выполнения диссертации выполнен значительный объем работы для доказательства возможности использования новых изолятов метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры.

В результате получен разноплановый фактический материал, который был систематизирован и изложен в доступной форме. Обоснованность полученных результатов подтверждена регистрацией новых таксонов с валидно опубликованными названиями в международном журнале по систематике, IJSEM и журнале Микробиология. Обоснованность полученных результатов доказана большим объёмом экспериментальных результатов, их успешной интерпретацией, статистической обработкой. Достоверность исследований подтверждается рациональным выбором используемых методов. Результаты достаточно полно описаны в тексте диссертации и подробно отражены в графиках, сводных таблицах, диаграммах и схемах.

**Практическая значимость работы** определяется созданием уникальной коллекции биотехнологически перспективных штаммов метанотрофов, имеющих высокий потенциал для использования в качестве продуцентов кормового белка из метана. Полученный в работе штамм *Methylococcus capsulatus* MIR с делециями генов гликогенсинтаз *glgA1* и *glgA2* имеет сокращенную лаг-фазу с быстрым переходом к логарифмической фазе роста, что экономически выгодно для биотехнологических процессов с использованием накопительного и отъемно-доливного режимов.

Новые штаммы рода *Methylomonas* способны продуцировать обогащенный каротиноидами биопротеин, который может быть востребован на рынке кормов для аквакультуры, а изолят рода *Methylo Marinum* может найти применение в технологии получения биопротеина на морской воде или грунтовых водах повышенной солености, что актуально для производств, расположенных в регионах с дефицитом пресной воды.

**Структура диссертации.** Диссертация Сулейманова Руслана Закиевича написана с использованием классической структуры и включает: введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение и выводы. Работа изложена на 130 страницах, включая 11 таблиц, 28 рисунков и списка литературы из 198 наименований. Все основные положения и выводы диссертации опубликованы в 12 печатных работах: 9 экспериментальных статьях и 3 тезисах конференций.

Обзор литературы состоит из пяти глав. В первой главе автор дает исчерпывающую характеристику экологической ценности и важности всей группы метанотрофов в экосистеме, в понимании не только эволюционных связей между метанотрофией и автотрофией, но и позволяет расширить представления о глобальном вкладе этих микроорганизмов в сокращения выбросов двух основных парниковых газов в атмосферу Земли. Рассмотрены физиологические типы аэробных метанотрофов (термотолерантные и термофильные, галотолерантные и галофильные метанотрофные бактерии). Таким образом была подготовлена теоретическая база для исследования этих групп в диссертационной работе.

Во второй главе рассматриваются пути окисления метана и метанола, а также ферментные системы их окисления до CO<sub>2</sub> аэробными метанотрофными бактериями. Подробно рассмотрены пути ассимиляции C1-соединений, участвующих в анаболизме

у метанотрофных бактерий. В третьей главе уделяется внимание молекулярным методам идентификации метанотрофных бактерий, а также методам, применяемым для изучения экологии метанотрофных бактерий. Четвертая глава посвящена сравнению методов, используемых для разработки надежных методов генетической модификации (двойная гомологичная рекомбинация на основе суицидального вектора, безмаркерные мутации метанотрофных бактерий, CRISPR/Cas9-опосредованный мутагенез метанотрофов и методы трансформации метанотрофных бактерий), так как подобные технологии неоднократно подтверждали свою эффективность для увеличения объема и качества требуемого продукта.

В пятой главе был продемонстрирован биотехнологический потенциал метанотрофов, как продуцентов белков, биополимеров, каротиноидов, липидов, метанола, органических кислот, эктоина, витамина B<sub>12</sub>, сахарозы и др.

Глава «Материалы и методы исследования» разделена на подглавы, которые отражают разнообразные аспекты методологических подходов: микробиологические, биоинформатические, биохимические и молекулярно-генетические.

Глава «Результаты и их обсуждение». В первую очередь хочется отметить четко обоснованную логику исследования: поиск, выделение, идентификация и характеристика новых быстрорастущих представителей рода *Methylococcus*; таксономическое описание новых видов рода *Methylomonas* и *Methylomarinum*; изучение биотехнологически перспективных штаммов метанотрофов на уровне культур и масштабирование процессов с использованием биореакторов.

В настоящей работе были описаны два новых вида аэробных метанотрофных бактерий рода *Methylomonas*, *Mm. rapida* и “*Mm. montana*”. *Mm. rapida* обладает высоким биотехнологическим потенциалом в силу высоких скоростей роста на метане, до 0.33 ч<sup>-1</sup>. “*Mm. montana*” – это первый вид рода *Methylomonas*, представители которого не способны к синтезу каротиноидов. Типовые штаммы новых видов были депонированы в международных коллекциях микроорганизмов.

В ходе работы по поиску метанотрофов-продуцентов, способных расти на морской воде (36 г NaCl/л), был получен изолят галотолерантных метанотрофных бактерий рода *Methylomarinum*, штамм Ch1-1<sup>T</sup>, который был описан в качестве нового вида рода *Methylomarinum*, “*Mr. roseum*” sp. nov. Анализ продуцируемой биомассы при нестерильном проточном культивировании показал содержание белка до 67.6%. Полученные данные являются основой для дальнейших исследований возможности получения кормового белка на природном газе и морской воде.

С помощью получения мутантов были исследованы последствия выключения генов синтеза запасных соединений. Ярким исследованием работы является получение модифицированного штамма *Methylococcus capsulatus* MIR с делецией 2-х генов гликогенсинтаз (*ΔglgA1ΔglgA2*) и проведение сравнения его характеристик с таковыми у штамма дикого типа.

В условиях культивирования в биореакторе не синтезирующий гликогена штамм  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  не уступал штамму дикого типа в скоростях роста ( $0.3 \text{ ч}^{-1}$  в накопительном и  $0.25 \text{ ч}^{-1}$  в проточном режимах) и показал даже более быстрый переход к логарифмической фазе роста, что экономически выгодно для биотехнологических процессов с использованием накопительного и отъемно-доливного режимов. Как штамм дикого типа, так и модифицированный штамм  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  демонстрировали высокое содержание белка в продуцируемой биомассе в режиме проточного культивирования – до 71%.

Актуальность, новизна и прикладное значение работы находятся на высоком уровне.

Исследования Сулейманова Руслана Закиевича позволят сделать ряд выводов для смежных областей изучения метанотрофов.

Отдельно хочется отметить методологическую базу. Автор использовал ряд разнообразных методов, начиная от классического культивирования микроорганизмов, биохимического измерения активности до создания нокаут мутантов, генетических и биоинформатических подходов. Все эксперименты выполнены в необходимом количестве повторностей для статистической достоверности. Полученные результаты опубликованы в ряде известных журналов: *Frontiers in Microbiology*, *Microbiology Resource Announcements*, *Microorganisms*, *Systematic and Applied Microbiology*, *Fermentation*, *Микробиология*. Таким образом, полученные результаты обоснованы и достоверны.

Полученные Сулеймановым Русланом Закиевичем результаты представляют исключительную ценность для науки и практики. По работе принципиальных замечаний нет. Работа настолько выверена логически и методически, что не вызвала явных вопросов. Пришлось постараться, чтобы выискать вопросы:

1. Для культивирования галофильных метанотрофов в биореакторе использовали питательную среду MOR, в которой фосфатный буфер был заменен на 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в количестве  $250 \text{ мкл л}^{-1}$ . Чем вызвана такая замена?
2. Штамм *Methylococcus capsulatus* MIR не обладает рядом характеристик, заявленных как целевые, таких как синтез каротиноидов или рост на морской воде. Какие физиологические или биотехнологические преимущества обусловили выбор именно этого штамма в качестве объекта исследования? Рассматривалась ли возможность использования других штаммов, например, *Methylomonas rapida* MP1, который демонстрирует способность к синтезу каротиноидов?
3. Возможен ли подход, предполагающий создание синтетических консорциумов на основе совместного использования нескольких штаммов/видов/родов метанотрофов для комплексного решения задач?

Сформулированные выше вопросы не уменьшают степени новизны и качества проведенных исследований, не противоречат заявленным задачам и не умаляют

исключительной научно-практической значимости полученных результатов, правомерности основных защищаемых положений и выводов данной диссертационной работы. Автореферат соискателя в полной степени отражает положения, выводы и рекомендации, содержащиеся в диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Сулейманова Руслана Закиевича представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу, представляющую собой решение научной проблемы – поиск новых биотехнологически перспективных штаммов метанотрофных бактерий и путей оптимизации их метаболизма для улучшения ростовых характеристик. Работа, что очень важно, имеет большое практическое значение. Диссертация полностью соответствует требованиям ВАК п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в ред. 26.10.2023), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – «Микробиология».

#### Официальный оппонент:

Профессор кафедры биохимии и физиологии клетки  
медико-биологического факультета  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Воронежский государственный университет»,  
доктор биологических наук,  
профессор по специальности микробиология



Грабович Маргарита Юрьевна

Адрес: Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл. 1  
Тел: +7 (473)220-88-77; e-mail: [margarita\\_grabov@mail.ru](mailto:margarita_grabov@mail.ru)

