

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Кристины Юрьевны Сапожниковой по теме «Микробиологический синтез полигидроксиалcanoатов на жироодержащих субстратах», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология

Актуальность диссертационной работы Кристины Юрьевны Сапожниковой, посвященной исследованию биотехнологического синтеза полигидроксиалcanoатов (ПГА) на жироодержащих субстратах и изучению состава и физико-химических свойств синтезированных ПГА, обусловлена необходимостью решения глобальных проблем, связанных с неизбежным исчерпанием природных ресурсов в концепции растратной экономики, по которой развивается цивилизация в настоящее время. Биотехнологические решения позволяют использовать не просто возобновляемое сырьё, а малооцененные отходы, и, благодаря широкому органотрофному потенциалу микроорганизмов, превращать их в востребованные экономикой продукты с высокой добавленной стоимостью. Ярким примером изящных биотехнологических решений является синтез ПГА – биополимеров, позволяющих заменить традиционные пластики в широком спектре отраслей, включая биомедицину. Широкому внедрению ПГА препятствует их высокая себестоимость, поэтому поиск дешевых субстратов является актуальным. В работе обоснован выбор в качестве углеродного субстрата жироодержащего сырья, в том числе жировых отходов животного происхождения, – это нетривиальное решение, никогда ранее не обсуждаемое в России и мало обсуждаемое в мировой литературе.

Целью диссертационной работы Кристины Юрьевны Сапожниковой является исследование специфики биотехнологического синтеза ПГА на жироодержащих субстратах, а также изучение состава и физико-химических свойств синтезированных ПГА. Все поставленные задачи (исследование роста культуры *Cupriavidus necator* B-10646 на различных жироодержащих субстратах растительного и животного происхождения, биосинтез сополимерных ПГА и изучение состава и свойств синтезированных ПГА) успешно решены в ходе выполненных методически сложных исследований.

Структура диссертационной работы традиционна, состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, трех глав, содержащих описание результатов экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 184 источника, из которых 179 – на английском языке. Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста. Результаты исследования последовательно и логично сформулированы, хорошо структурированы, проиллюстрированы 32 рисунками и 15 таблицами, авторские результаты приведены в сравнении с мировым опытом, каждая глава завершается заключением.

Во введении обоснована актуальность тематики исследования, обоснованы цель работы и задачи, представлены научная и практическая значимость, защищаемые положения.

Глава 1 (Обзор литературы) кратко, но ёмко, содержит информацию о биотехнологии ПГА, включая штаммы микроорганизмов, источники углерода, особенности метаболизма и особенности биосинтеза, свойства ПГА в зависимости от условий биосинтеза. Обзор выполнен на высоком уровне, логично и системно структурирован, начинается с исторического экскурса и заканчивается анализом современного мирового уровня выбранного направления исследований. Работа является образцовым примером академической работы школы Т.Г. Воловой, при этом автор знаком с научными работами других школ по ПГА, появившихся в России позднее. Особое внимание в обзоре уделено возможности биосинтеза сополимерных ПГА, включающих кроме 3-гидроксибутирата другие мономерные звенья, что обуславливает необычные свойства биопластиков: повышение прочности и улучшение механических свойств ПГА при одновременном снижении степени кристалличности и температуры плавления сополимеров. Особую ценность представляет обзор не только научных работ, но и действующих биозаводов по производству ПГА, с указанием реальных цен и узких мест производства.

Во второй главе (Объекты и методы исследования) приведен объект исследования (*Cupriavidus necator* B-10646), описаны использованные жирсодержащие источники углерода, представлена методология экспериментов, рассмотрены методы химического и микробиологического контроля сырья, продуцента, культуральной среды и продукта (ПГА). При проведении исследований использованы общепринятые адекватные методы исследований, привлечено современное аналитическое оборудование, что позволило автору эффективно решить поставленные задачи.

Третья экспериментальная глава посвящена исследованиям закономерностей синтеза ПГА на жирах растительного происхождения (использовано 4 образца растительных масел). Для понимания особенностей биосинтеза ПГА от жирнокислотного состава был исследован рост продуцента на химически чистых жирных кислотах (использовано 5 жирных кислот). Показана высокая липазная активность *Cupriavidus necator* B-10646 и способность к усвоению субстратов без лаг-фазы. Выявлено, что *Cupriavidus necator* B-10646 неравномерно потребляет отдельные жирные кислоты, предпочитая, во-первых, полиеновые кислоты, во-вторых, олеиновую кислоту. Установлено, что с удлинением углеродной цепи насыщенных жирных кислот наблюдается снижение показателей роста бактерий и синтеза ПГА.

Четвертая глава посвящена исследованиям закономерностей синтеза ПГА на жирах животного происхождения. В качестве источников углерода были использованы три отхода рыбопереработки и три низкосортных жира млекопитающих. Была установлена избирательность утилизации *Cupriavidus*

necator B-10646 жирных кислот в составе жиров, а именно: предпочтение длинноцепочечных полиеновых кислот. Выявлено, что наибольший урожай биомассы бактерий и содержание ПГА в клетках получены при культивировании бактерий на субстрате балтийской кильки, а наименьшие продукционные показатели зафиксированы при использовании свиного жира.

В пятой главе представлены результаты изучения химического состава и свойств ПГА, синтезированных на различных жиро содержащих субстратах. Установлено, что мономерный состав синтезированных ПГА зависит от жирового источника углерода. При утилизации насыщенных жирных кислот синтезируется исключительно поли (3-гидроксибутират), при утилизации олеиновой кислоты – сополимер с минорным включением 3-гидроксивалерата, а при утилизации сложных жиро содержащих субстратов синтезируются трехкомпонентные сополимеры с минорными включениями 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата. Сополимерные ПГА представляют особую ценность, поэтому был проведен биосинтез ПГА с использованием ряда прекурсоров. Использование в качестве прекурсора 3-гидроксивалерата калия позволило получить сополимеры с включением в ПГА до 51 % 3-гидроксивалерата, использование в качестве прекурсора ε-капролактона – сополимеры с включением до 7,4 % 4-гидроксибутират, что, в свою очередь, привело к существенным и желательным изменениям в свойствах ПГА: снижению молекулярной массы, температур плавления и деградации, степени кристалличности. Автор открыто пишет, что использование γ-валеролактона и 3-меркаптопропионовой кислоты оказалось неэффективным для получения сополимеров при использовании жиро содержащих углеродных субстратов, и научная честность украшает данную работу.

Итоговый раздел диссертации включает «Заключение» и «Выводы».

Необходимо отметить высокий уровень представления материалов диссертационной работы в виде автореферата: работа изложена компактно, целостно, при этом обозначена неоднозначность и научёмкость проблем, решаемых в работе. Выводы, сделанные в работе, соответствуют поставленным целям и задачам.

Достоверность результатов, представленных в работе, не вызывает сомнений. Для решения поставленных задач К.Ю. Сапожникова использует комплекс физико-химических, биохимических, биотехнологических, аналитических методов, что указывает на многопрофильный профессиональный уровень подготовки докторанта.

Cupriavidus necator B-10646 – непростой объект исследования, требующий большой подготовительной работы. Поскольку в качестве углеродного субстрата выступали жиро содержащие соединения, потребовалась сложная методология и был осуществлён огромный объём скрупулёзной работы, связанной с анализом химического и жирнокислотного состава углеродных субстратов и культуральных сред, контролем параметров

роста бактериальной культуры, определением внутриклеточного содержания ПГА, их мономерного состава и свойств синтезированных ПГА.

В работе использовано современное аналитическое оборудование, рассчитаны классические для биотехнологии производственные показатели роста бактерий и синтеза ПГА, проведена статистическая обработка результатов с помощью актуального программного обеспечения, опыты выполнены пятикратно – всё это несомненные достоинства работы.

Основные результаты работы широко обсуждались на научных конференциях всероссийского и международного уровня, новизна технического решения использования жировых отходов рыбопереработки для синтеза ПГА защищена патентом. Опубликовано 10 статей в журналах списка ВАК, все они индексируются в базе данных Scopus и относятся к Белому списку, 8 из них индексируются в базе данных WoS, 6 статей опубликованы в журналах высшей квартили Q 1, что свидетельствует о мировом уровне работы. Одна статья опубликована К.Ю. Сапожниковой без соавторов, что свидетельствует о зрелости её как ученого.

Научная новизна работы. Впервые в качестве источников углерода использована линейка жиро содержащих субстратов растительного и животного происхождения и показана способность негенномодифицированного штамма *Cupriavidus necator* B-10646 к росту бактерий и синтезу ПГА на этих источниках, при этом продуктивность по ПГА сопоставима с продуктивностью на фруктозе. Установлено, что использование отходов рыбопереработки, в частности, кильки балтийской, позволяет получить сополимерные ПГА с максимальными долями макровключений 3-гидроксивалерата и 4-гидроксибутиратом по сравнению с другими субстратами. Полученные полимеры характеризуются сниженными показателями молекулярной массы, температуры плавления и температуры деградации, степени кристалличности, что облегчает переработку этих полимеров в изделия. Закономерности синтеза ПГА на широкой линейке жиро содержащих субстратах изучены и сопоставлены впервые, что и составляет **теоретическую значимость работы**.

Практическая значимость работы заключается в том, что обоснован и реализован микробиологический синтез полимеров с высокой добавленной стоимостью – ПГА – при использовании дешевого углеродного субстрата, а именно: многотоннажных отходов рыбопереработки. При этом показана эффективность биосинтеза ПГА варьируемого мономерного состава и свойств, что позволяет получать разнообразные биопластики. В конечном итоге, достигается снижение экономических затрат на синтез ПГА.

Таким образом, работа обладает актуальностью, новизной и практической значимостью.

В качестве вопросов и замечаний к содержанию диссертационной работы можно отметить следующее:

1) Автором установлено, что для накопления биомассы и ПГА продуцент *Cupriavidus necator* B-10646 предпочитает полиеновые длинноцепочечные

жирные кислоты моноеновым, моноеноевые – насыщенным, короткоцепочечные насыщенные – длинноцепочечным насыщенным. Чем можно объяснить максимальные урожаи биомассы и ПГА на пальмовом масле, характеризующемся высоким содержанием насыщенных кислот?

2) Жирнокислотные составы субстратов из кильки балтийской и скумбрии атлантической близки, но при этом выход биомассы и ПГА из скумбрии атлантической существенно ниже, чем это можно объяснить?

3) Автор не высказал гипотезы, почему при синтезе сополимерных ПГА в присутствии прекурсоров именно при использовании кильки балтийской достигается максимальное макровключение 3-гидроксивалерата в составе ПГА – 50,6 мол. %? Можно ли это объяснить особенностями жирнокислотного состава сырья?

4) Вносились ли эмульгаторы в жирсодержащие субстраты и проводилось ли диспергирование сред?

5) В выводе 2 сравниваются экономические коэффициенты по урожаю биомассы, полученные на жировых субстратах и на сахараах, однако в работе такие расчеты не приводятся.

6) Каким образом предлагается собирать и складировать отходы рыбопереработки для масштабных процессов? Как осуществлять входной контроль сырья?

7) Для выделения ПГА из жирсодержащих сред используется хлористый метилен. Каким образом планируется проводить регенерацию растворителя в производственных условиях?

8) В каких отраслях экономики возможно применение пластиков, которые будут получены на основе ПГА из отходов рыбопереработки?

В тексте имеются опечатки. Так, на С. 89 в описании к таблице 15 упоминается, что для сополимеров наблюдается снижение температуры плавления, в то время как из табличных данных следует, что температуры плавления сополимеров, полученных из кильки балтийской, увеличиваются. В главе 2 методики описаны недостаточно подробно, так, не ясны объёмы растворов, содержащих магний, железо и азот, добавляемых к фосфатному буферному раствору; не ясно, каким образом реализовано двухстадийное периодическое культивирование с лимитированием роста бактерий по азоту; непонятно, каким образом проведена экстракция липидов гексаном из жидкой культуральной среды.

Указанные вопросы и замечания носят рекомендательный и дискуссионный характер, не являются принципиальными, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую высокую оценку работы.

Заключение

Диссертационная работа Кристины Юрьевны Сапожниковой является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной самостоятельно на высоком академическом уровне, характеризуется внутренним единством, полученные результаты обладают новизной

мирового уровня, научной и практической значимостью. Содержание диссертации соответствует заявленной научной специальности. В работе решается задача биотехнологического синтеза полигидроксиалканоатов на жиросодержащих углеродных субстратах, что имеет большое значение для развития биотехнологии в РФ.

Работа Кристины Юрьевны Сапожниковой полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней» (утверждено постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, в действующей редакции), предъявляемым ВАК Министерства науки и высшего образования РФ к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Даю согласие на обработку персональных данных, включения их в аттестационное дело соискателя, вывешивание отзыва на сайте ФГБНУ «ФИЦ «Красноярский центр СО РАН».

Официальный оппонент:

Екатерина Анатольевна Скиба

доктор технических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология (год присуждения – 2023),

доцент по кафедре биотехнологии (год присуждения – 2010),

ведущий научный сотрудник лаборатории биоконверсии,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), 659322, Российская Федерация, Алтайский край, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,

+7 [redacted] 14-15,

e [redacted] @mail.ru

 Екатерина Анатольевна Скиба

20 января 2025 г.

Подпись Е.А. Скибы заверяю,

Ученый секретарь ИПХЭТ СО РАН

 А.Г. Суханова

