

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Шибзуховой Карины Ахмедовны на тему: «Сравнительная характеристика зелёных микроводорослей - продуцентов арахидоновой кислоты на основе полифазного подхода» по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений (биологические науки)

В последние двадцать лет наблюдается взрывной интерес к биотехнологии основанной на культивировании фотоавтотрофных микроорганизмов - цианобактерий и микроводорослей - являющихся перспективным источником получения экологически чистого и/или возобновляемого сырья. Используя диоксид углерода атмосферы и солнечный свет, данные объекты способны синтезировать широкий спектр уникальных молекул и накапливать в своих клетках ценные биопродукты - антиоксиданты, витамины, полиненасыщенные жирные кислоты, красители, полисахариды, УФ-протекторы. В странах с теплым климатом появилось много крупных предприятий по культивированию микроводорослей, например, Cyanotech, Mera Pharmaceuticals Inc. (Гавайи), Jingzhou Natural Astaxanthin Inc (Китай), Algaetech International (Малайзия), Parry Nutraceuticals (Индия) и др. В Российской Федерации массовое культивирование микроводорослей в настоящее время к сожалению отсутствует, хотя природно-климатические условия Черноморского побережья Краснодарского края, Крыма, Ставрополя, пригодны для организации такого производства. Поэтому в Российской Федерации за последние 203 года делается все необходимое для организации таких производств.

Стратегия получения биомассы микроводорослей максимально обогащенной целевым продуктом включает на первом этапа поиск и селекцию эффективных продуцентов ценных соединений в природе и в существующих ресурсных центрах, их идентификацию, скрининг и селекцию штаммов продуцентов, способных к накоплению целевых продуктов. Поэтому диссертационная работа Шибзуховой К.А. «Сравнительная характеристика зелёных микроводорослей - продуцентов арахидоновой кислоты на основе полифазного подхода», посвящена именно этим вопросам, не вызывает сомнения в актуальности исследований.

В работе с применением широкого спектра методов проведена ревизия восьми коллекционных штаммов микроводорослей из 2-х ресурсных центров РФ, с применением полифазного подхода. На основе полученных данных и литературных источников, впервые проведён сравнительный таксономический анализ микроводорослей родов *Parietochloris*, *Myrmeisia* и *Lobosphaera*. Впервые показана возможность использования сорбентов на основе полиэтиленгликолей для иммобилизации и культивирования микроводорослей. Исследовано влияние иммобилизации на физиолого-биохимические особенности, в частности на накопление полиненасыщенных

жирных кислот в биомассе микроводорослей. В коллекциях ресурсных центров РФ отобраны и охарактеризованы с применением полифазного подхода перспективные штаммы микроводорослей-продуцентов полиненасыщенных жирных кислот, в особенности арахидоновой, линолевой и α -линоленовой кислот. Полученные штаммы микроводорослей с высоким содержанием ДЦ-ПНЖК в биомассе являются перспективными штаммами для использования в фотобиотехнологии массового культивирования микроводорослей. Разработанные новые сорбенты на основе полиэтилениминов могут быть использованы в фотобиотехнологии на этапах сбора биомассы микроводорослей при интенсивном культивировании в промышленных масштабах, а также с целью ликвидации неконтролируемого «цветения» водоёмов. .

Степень **достоверности** полученных результатов определяется достаточным объемом выборки. Накопленный автором фактический материал корректно обработан с использованием математических методов статистики.

Результаты работы доложены на 6 международных конференциях, 5 – Всероссийских конференциях с международным участием. Основные результаты работы изложены в 6 публикациях, индексируемых в наукометрических базах данных Scopus и/или Web of Science.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа Шибзуховой К.А. носит целостный и завершённый характер, построена по традиционной схеме, изложена на 156 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, обсуждения результатов исследования, заключения, выводов и списка литературы (334 источников). Работа проиллюстрирована 9 таблицами и 41 рисунком, также представлен список использованных сокращений.

Глава 1 - «Обзор литературы» изложена на 33 страницах (что составляет пятую часть объема диссертации) и поделена автором на 3 части. В первой главе обосновывается перспективность биотехнологии на основе культивирования оксигенных фототрофных микроорганизмов, как источника ценных для человека биомолекул. Автор приводит сведения о видах продуцентов БАВ и продуктах, которые получают на основе штаммов микроводорослей. Во второй части, дается актуальное описание и систематическое положение микроводорослей родов *Parietochloris*, *Myrmecia* и *Lobosphaera*, обосновывающие ценность данных микроводорослей для биотехнологии, как продуцента важных для человека ПНЖК. В третьей части обзора литературы представлен анализ методов иммобилизации клеток микроводорослей на носителях различной природы, как перспективного направления биотехнологии, описаны и применяемые методы сбора их биомассы. Рассмотрено влияние иммобилизованного состояния на физиологию микроводорослей.

Глава 2 диссертации посвящена характеристике объектов и методов исследования. Для решения поставленных задач автор удачно применил в

работе морфологический, молекулярно-генетические, физиологические и биохимические подходы.

Не останавливаясь подробно можно лишь отметить, что К.А.Шибзухова использовала в своих исследованиях широкий круг как классических, так и современных и оригинальных методов исследования. Глава отражает большой объем работы, проведенной автором. Выбор объектов и методов полностью адекватен поставленным задачам исследования.

Глава 3 диссертации содержат материалы непосредственно авторских исследований и состоит из 3 разделов.

В первом разделе третьей главы автором использованы различные микроскопические методы исследования - световая, люминесцентная, сканирующая и трансмиссионная микроскопии. Это позволило описать жизненные циклы штаммов микроводорослей, особенности ультраструктурной организации поверхности клеток и их строение. Проведена оценка влияния стрессовых факторов (дефицита азота в среде культивирования и низкой температуры) на структуру клеток. Это позволило установить, что только ряд из исследованных штаммов соответствует таксономическому диагнозу микроводорослей рода *Parietochloris*. Полученные результаты позволили сузить круг объектов исследования до 5 штаммов.

В следующем разделе данной главы автором проведена мультилокусная молекулярно-генетическая идентификация штаммов микроводорослей и показано, что четыре из пяти выбранных штаммов - NAMSU 924/2, NAMSU 925/2, NAMSU (= CALU) 1497 и NAMSU (= ACKU) 177-03 близкородственны представителям рода *Lobosphaera*. Автор обращает внимание на то, что данные проведенных филогенетических исследований не согласуются с результатами морфологических и ультраструктурных исследований, особенностей жизненного цикла микроводорослей, в частности, способности к размножению подвижными зооспорами, а также с диагнозом таксона *Lobosphaera*, что позволяет сделать заключение о том, что для уточнения таксономического положения исследованных штаммов микроводорослей и разрешения вопросов филогенетических отношениях между родами *Parietochloris*, *Myrmecia* и *Lobosphaera* необходимо сравнительное изучение с типовыми видами микроводорослей с привлечением комплекса данных, полученных с применением полифазного подхода.

В следующем разделе данной главы исследованы ростовые и биосинтетические характеристики 5 штаммов микроводорослей при выращивании как в стандартных условиях, так и условиях моделирующих стресс - дефицит азота и низ/или низкая температура.

В следующем разделе представлены результаты по изучению особенностей накопления биологически активных веществ в биомассе микроводорослей в разных условиях культивирования. Автором отмечены корреляции условиями культивирования и накоплением ПНЖК, в том числе, и маркерной арахидоновой кислоты.

В последнем разделе данной главы Кариной Ахмедовной впервые исследована возможность применения полимеров на основе полиэтиленimina для иммобилизации клеток микроводорослей на примере штаммов *Lobosphaera* sp. NAMSU 925/2 и *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1. В работе использованы 2 типа сорбентов полученных двумя различными способами полимеризации полиэтиленimina двумя сшивающими агентами. Изучены особенности структуры сорбентов, выявлены особенности иммобилизации клеток микроводорослей на выбранных сорбентах, кинетика и эффективность иммобилизации. Выявлена зависимость иммобилизации клеток от концентрации сшивающего агента в полимере и способа его полимеризации.

Оценка влияния сорбентов на жизнеспособность клеток микроводорослей иммобилизованных на сорбенте на основе измерения фотосинтетической активности методом импульсно-моделированной флуориметрии, показала, что для сорбентов полученных методом криополимеризации полиэтиленimina с диэтиленгликоль диглицидиловым эфиром, степень ингибирования фотосинтетической активности зависела от соотношения сшивающих агентов. Иммобилизация микроводоросли *Lobosphaera* sp. NAMSU 925/2 на сорбенте полученном методом криополимеризации с массой сшивающего агента 60% показала, что иммобилизованное состояние клеток способствует существенному увеличению накопления в них маркерной арахидоновой кислоты, что позволяет автору рекомендовать данный сорбент для дальнейших исследований с целью применения при аппаратном выращивании микроводорослей. С моей точки зрения, полученные автором результаты могут являться основой для проведения пилотных испытаний в биотехнологии массового культивирования микроводорослей.

В заключении К.А. Шибзухова подводит общий итог полученных результатов, обсуждает наиболее важные моменты и перспективы дальнейших исследований.

В целом следует отметить что:

1. Диссертация К.А. Шибзуховой представляет собой фундаментально-прикладной труд, характеризующийся внутренним единством, носит **целостный и завершённый характер**.

2. Объем проведенных исследований, их анализ позволяют сделать вывод, что диссертанту удалось **решить поставленные в работе задачи** и достичь намеченной цели. При решении поставленных задач автором использован набор адекватных современных методов.

3. На основании обширного фактического материала диссертант пришел к выводам, которые логично вытекают из содержания работы. Научные положения и заключение, сформулированные автором в работе, **обоснованы** достаточным размером выборочных совокупностей и современными методами исследований, использованными в работе.

Выводы, сформулированные К.А. Шибзуховой в диссертации, опираются на большой, тщательно проанализированный теоретический и

экспериментальный материал и, таким образом, **обоснованы и достоверны**. Достижением автора является создание коллекции альгологически чистых культур микроводорослей, представляющих интерес как перспективных продуцентов ценных длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот.

Автореферат диссертации соответствует всем требованиям и в полной мере отражает ее содержание.

Основное содержание диссертации **обсуждено** на международных, всероссийских и межрегиональных конференциях, а также отражено в 12 научных работах, включая 6 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям, изложенным в диссертации.

Диссертация не свободна от некоторых недостатков. К замечаниям по работе следует отнести следующее:

1. На рис. 22 представлены кривые роста некоторых штаммов микроводорослей в течение двух недель роста на средах Громова и BG-11 значительно различающихся содержанием минеральных солей. Из приведенных данных следует, что на среде BG-11, микроводоросли в течение двух недель эксперимента не выходят на стационарный рост. В связи с этим, было необходимо продолжить культивирование штаммов как минимум до 21 суток и провести анализ биомассы на содержание ПНЖК на этой среде именно на этой стадии.

2. На рисунках 3 и 4 необходимо было бы уточнить, чьи это схемы – диссертанта или заимствованы из научных статей других авторов?

3. В тексте нарушена нумерация рисунков, например, на странице 85 приведен рисунок № 5, хотя по последовательности должен быть рисунок № 18.

4. В диссертации во введении указано, что «Основные результаты работы изложены в 7 публикациях, индексируемых в Scopus и/или Web of Science», а в автореферате 6 публикаций, что соответствует действительности.

5. Целесообразно все главы и подразделы пронумеровать для большего понимания подчинения излагаемого материала. В диссертации присутствуют главы 1, 2, 4. А где глава 3?

6. Желательно в тексте применять более научные выражения и словосочетания. Например, чашки Петри не следует называть просто «чашки», культуру мы пересаживаем, культивируем, а не она сама пересаживается, культивируется и т.д.

7. В диссертации и автореферате автор использует много аббревиатур, что затрудняет осмысление представленного материала.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности по специальностям 03.01.05 –

«Физиология и биохимия растений» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Шибзухова Карина Ахмедовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук
профессор, заведующая кафедрой биотехнологии
РГАУ - МСХА имени К.А.Тимирязева

Калашникова Елена Анатольевна

Калашникова Елена Анатольевна, доктор биологических наук, 03.00.23 – Биотехнология, профессор, заведующая кафедрой биотехнологии

Контактные данные:

тел.:

e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация: 03.00.23 – Биотехнология

Адрес места работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет - Московская сельскохозяйственная академия имени К.А.Тимирязева» ФГБОУ ВО «РГАУ - МСХА имени К.А.Тимирязева», 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49,

Тел.

Факс: