

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Сорокина Бориса Андреевича на тему

**«Биотехнологическое исследование новых штаммов микроводорослей-продуцентов
каротиноидов и полиненасыщенных жирных кислот»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.6. «Биотехнология»

Диссертационная работа Сорокина Бориса Андреевича посвящена поиску и изучению пресноводных микроводорослей, способных к быстрому накоплению биомассы при выращивании в фотобиореакторах и оценке их потенциала в качестве компонентов кормов для рыб. Корма для рыб являются большой проблемой для дальнейшего развития рыбоводства. На сегодняшний день основой качественных кормов являются рыбная мука и рыбий жир, которые являются дорогими и дефицитными компонентами кормов. Рассматриваемая диссертационная работа Сорокина Б.А. предлагает альтернативное решение проблемы создания кормовой базы для рыбной отрасли – использование потенциала микроводорослей.

Актуальность темы диссертации

Актуальность темы диссертационной работы Сорокина Б.А. обусловлена значительным потенциалом микроводорослей для решения широкого круга проблем. Микроводоросли способны накапливать с высокой скоростью биомассу, содержащую биологически активные вещества, используя углекислый газ в качестве основного источника углерода и солнечный свет в качестве энергии. Эта их способность может найти применение в системах регенерации для замкнутых систем, а также для производства высокомаржинальных продуктов, включая каротиноиды, ненасыщенные жирные кислоты и др., в том числе кормовых ингредиентов для аквакультуры. Ввиду истощения природных ресурсов, поиск новых штаммов микроводорослей, в том числе из уникальных эконип (пресноводные микроводоросли), способных к быстрому накоплению биомассы с высоким содержанием биологически активных веществ при выращивании в фотобиореакторах - является актуальной задачей для биотехнологии.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

Работа соискателя хорошо спланирована, в ней используются общепринятые методики и техники, адаптированные к задачам исследования. Эксперименты проведены с использованием современного оборудования, в том числе полупромышленного фотобиореактора, с соблюдением всех необходимых требований к качеству лабораторной работы. Повторность основных экспериментов достаточна для проведения их статистической обработки. Все выводы диссертационной работы Сорокина Б.А. обоснованы и базируются на большом экспериментальном материале, полностью отражают результаты работы.

Таким образом, выносимые на защиту положения и выводы являются достоверными и обоснованными, т.к. они основаны на использовании надежных и воспроизводимых методов микробиологии, биотехнологии и биохимии.

Новизна работы, прежде всего, заключается в уникальных объектах исследований. Впервые в работе были охарактеризованы и исследованы пресноводные штаммы микроводорослей *Mallomonas furtiva* SBV-13 и *Vischeria magna* SBV-108, обладающих способностью накапливать каротиноид фукоксантин и жирную ненасыщенную кислоту - эйкозапентаеновую кислоту - в рекордных количествах, превышающих уровни, описанные в литературе. Кроме того, получены доказательства того, что биомасса *Vischeria magna* SBV-108 улучшает питательную ценность кормов, что позволяет рассматривать *V. magna* SBV-108 в качестве перспективного кандидата для промышленного производства кормовых ингредиентов для аквакультуры

Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.

В диссертационной работе Сорокина Б.А. впервые была проведена оценка использования микроводорослей из пресных водоемов в качестве продуцентов биологически активных веществ. Проведенные исследования позволили сделать вывод о значительном потенциале пресноводных микроводорослей для синтеза каротиноидов и ненасыщенных жирных кислот. Таким образом, в результате работы Сорокина Б.А. расширена ресурсная база для биотехнологии за счет включения новых биологических объектов - пресноводных микроводорослей.

С практической точки зрения важными являются результаты получения 2 штаммов микроводорослей, продуцирующих значительные количества БАВ. Один из этих штаммов - *Mallomonas furtiva* SBV-13, способен накапливать 25,9 мг/г фукоксантина – каротиноид оранжевого цвета, обладающий высокой антиоксидантной активностью. Другой штамм -

Vischeria magna SBV-108, способен накапливать 46,1 мг/г эйкозапентаеновой кислоты – незаменимой полиненасыщенной жирной кислоты. Уровни продукции позволяют рассматривать изучаемые штаммы в качестве перспективных продуцентов для промышленного использования.

Еще одним результатом, имеющим практическое значение, является факт повышения питательных свойств кормов после добавления в них биомассы *Vischeria magna* SBV-108. Добавление биомассы *Vischeria magna* SBV-108 в количестве 10% в стартовый корм для мальков тилапии приводило к увеличению их массы на 20%.

Содержание диссертации.

Рассматриваемая диссертационная работа изложена на 132 страницах и состоит из традиционных разделов - Введение, Обзор литературы, Экспериментальная часть, Заключение, Выводы и Список литературы, включающего 314 наименований. Полученные экспериментальные данные сведены в 21 таблицу и проиллюстрированы 20 рисунками. Текст диссертации изложен в хорошем научном стиле.

Во введении к диссертационной работе представлены цели и задачи работы, обоснована её актуальность, научно-практическая значимость проводимых исследований, описаны объекты, методы и методология исследования, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулирован личный вклад автора, перечислены положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы в соответствии с целями и задачами исследования подробно обсуждаются проблемы развития аквакультуры с упором на обеспечение кормами для рыбоводства. Значительное внимание уделяется использованию микроводорослей в качестве пищевых и кормовых добавок, при этом отдельно обсуждается использование микроводорослей в качестве продуцентов белка, полиненасыщенных жирных кислот и каротиноидов. С учетом перспектив использования микроводорослей в качестве компонентов кормов, автор критически рассматривает достоинства и недостатки различных систем масштабного культивирования микроводорослей. Обзор литературы свидетельствует о том, что автор хорошо ориентируется в проблеме, способен на критический анализ и обобщения. Единственное замечание к этой части работы связано с тем, что диссертант при обсуждении продукции биологически активных веществ (каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты) ограничивается только микроводорослями как продуцентами. Чтобы понимать общую ситуацию с продукцией этих компонентов для кормов, представляется целесообразным в качестве сравнения рассмотреть значение других биологических систем в продукции этих компонентов.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методы молекулярной идентификации штаммов микроводорослей, методы работы с микроводорослями. Значительное внимание уделено культивированию микроводорослей в полупромышленном фотобиореакторе Lumian AGS 260. К сожалению, автор не обсуждает преимущества данной системы для выращивания микроводорослей, что затрудняет оценку эффективности данной системы. В соответствии с решаемыми задачами автор приводит методики определения концентрации сухой биомассы, питательных веществ в культуральной жидкости, оценки жизнеспособности клеток микроводорослей. Детально описано определение содержания фукоксантина и различных жирных кислот в биомассе микроводорослей с помощью ВЭЖХ, а также методы определения содержания белка, жиров, углеводов, золы и энергии в биомассе микроводорослей, мясе рыбы, и образцах кормов. Описание методик дается с достаточной детализацией, что обеспечивает их воспроизводство и оценку достоверности.

Глава «Результаты» состоит из трех разделов, включая:

- Биотехнологическое исследование штамма *Vischeria magna* SBV-108
- Биотехнологическое исследование штамма *Mallomonas furcivora* SBV-13
- Исследование влияния включения биомассы *Vischeria magna* SBV-108 и *Mallomonas furcivora* SBV-13 в стартовый корм на ростовые характеристики и эффективность кормления мальков тилапии.

В каждом из этих разделов автору удалось получить ряд новых результатов, имеющих принципиальное значение для изучения микроводорослей. Важнейшим результатом первого раздела является штамм *V. magna* SBV-108, способный продуцировать полиненасыщенную жирную кислоту - эйкозапентаеновую кислоту в значительном количестве. Максимальный выход эйкозапентаеновой кислоты при культивировании был достигнут на 14 день культивирования и составил 186,6 мг/л. Сравнительный анализ данных литературы, позволили автору сделать вывод, что пресноводная микроводоросль *V. magna* SBV-108 является лидером по данному показателю среди всех описанных в литературе природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании. Это демонстрирует высокий потенциал новой группы биологических ресурсов - пресноводных микроводорослей продуцировать незаменимые жирные кислоты. Однако чтобы понимать перспективы промышленного производства следует помнить, что грибы *Mortierella alpine* способны продуцировать в 4-5 раз больше, чем микроводоросли, до 800 -1000 мг/л. Поэтому очень важно анализировать преимущества различных методов синтеза для определения перспектив промышленного применения.

Важнейшим результатом второго раздела является штамм *Mallomonas furtiva* SBV-13, способный продуцировать каротиноид фукоксантин в значительном количестве. Максимальный выход фукоксантина при культивировании в фотореакторе был достигнут на 14 день культивирования и составил 53,7 мг/л, при этом штамм накапливал в клетках большие количества каротиноида фукоксантина – 26,1 мг/г сухой массы, что является наивысшим значением среди известных в настоящий момент природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании. Это очень интересный результат, который демонстрирует высокий потенциал пресноводных микроводорослей продуцировать каротиноиды. Хорошо известны микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, накапливающие другой каротиноид астаксантин до 3-5% от сухого веса при действии неблагоприятных условий окружающей среды. Однако новый штамм *Mallomonas furtiva* может являться источником генов биосинтеза каротиноидов для конструирования суперпродуцентов. Сегодня такие работы активно развиваются на дрожжах. Рекомбинантные штаммы дрожжей сегодня продуцируют до 1000 мг/л астаксантина и свыше 5000 мг/л бета-каротина.

Наконец, в последнем разделе работы представлены результаты влияния биомассы *Vischeria magna* SBV-108 и *Mallomonas furtiva* SBV-13 на эффективность кормления мальков тилляпии при их включении в стартовый корм. Здесь получен очень интересный результат - добавление в корм 10 % биомассы *V. magna* SBV-108 привело к увеличению усвояемости корма и показало наилучшие результаты конверсии корма, прироста на 1 г кормового белка, а также эффективности использования белка и энергии по сравнению с остальными исследованными кормами. Очень жаль, что автор ограничился только констатацией этого факта, не пошел в своих исследованиях дальше, чтобы установить причины такого эффекта. С чем связан стимулирующий эффект биомассы *Vischeria magna* SBV-108 и почему отсутствует аналогичный эффект биомассы *Mallomonas furtiva* SBV-13. Будем это рассматривать как пожелания для дальнейшей работы.

Таким образом, диссертант успешно решил все задачи работы – обнаружил новые штаммы пресноводных микроводорослей, показал их значительный потенциал в производстве биологически активных компонентов, а также продемонстрировал высокую эффективность использования биомассы микроводорослей в кормлении мальков рыбы.

Несмотря на успешное решение задач диссертации, имеются многочисленные замечания к представленной работе:

1. В работе не указано происхождение штаммов микроводорослей, используемых в работе. Складывается ощущение, что штаммы просто появились ниоткуда.

2. В списке работ, опубликованных по теме диссертации, содержится 5 публикаций. Однако в тексте диссертации отсутствуют отсылки к материалам, содержащимся в 2 публикациях (под номерами 3 и 4).

3. Одной из целей работы является поиск новых штаммов, способных продуцировать большие количества каротиноида фукоксантина и полиненасыщенной жирной кислоты – эйкозапентаеновой кислоты. И автор действительно обнаружил штаммы, которые являются чемпионами среди известных микроводорослей. Однако, чтобы понимать перспективы промышленного производства того или иного способа следует помнить о существующих альтернативах. Поэтому очень важно анализировать преимущества различных методов синтеза для определения перспектив промышленного применения.

4. Учитывая, что работа проходит по специальности «Биотехнология», хотелось бы видеть в работе более детальные сведения о технологии культивирования. К сожалению, в работе не представлены экспериментальные данные о технологии культивирования, а приводится только суммарный результат такого выращивания микроводорослей.

Несмотря на многочисленные замечания, следует отметить, что все замечания касаются не столько сути работы, сколько способа представления результатов и их обсуждения.

Опубликование результатов диссертации в научной печати.

Результаты и выводы диссертационной работы Сорокина Б. А. в полном объеме представлены в печатных работах - 3 статьях, опубликованных в высокорейтинговых международных журналах (Journal of Applied Phycology, Biotechnology Journal), рекомендованных ВАК АК МОН РФ. Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации. Автореферат диссертации отражает основное содержание проведенных научных исследований.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней

Диссертационная работа Сорокина Бориса Андреевича «Биотехнологическое исследование новых штаммов микроводорослей-продуцентов каротиноидов и

полиненасыщенных жирных кислот», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой, которая по актуальности проведенного исследования, уровню решения поставленных задач, новизне, научной и практической значимости полученных результатов соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 и изм. от 26.05.2020), и её автор Сорокин Борис Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент

Яненко Александр Степанович, доктор биологических наук, профессор, заместитель руководителя Курчатовского комплекса НБИКС-ПТ по научной работе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (Адрес: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, 1, тел.: +7 (499) 196-90-53, e-mail: Yanenko_AS@nrcki.ru)

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, профессор

А.С. Яненко

Подпись А.С. Яненко заверяю

Первый заместитель

главного ученого секретаря

НИЦ «Курчатовский институт»



К.Е. Борисов

«26» декабря 2024 г.