



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

17 февраля 2025 № 85-01-19/151

На №

От

Отзыв ведущей организации
на диссертацию Д.В. Кузьмина

Г
«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФИЦ Биотехнологии РАН
д.б.н. А.Н. Федоров



2025

Отзыв

ведущей организации Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) по диссертационной работе Кузьмина Дениса Владимировича «Разработка платформы по получению биологически активных соединений из фотосинтезирующих микроорганизмов», представленной к защите в диссертационном совете 24.1.016.01 (Д 006.027.01), на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы

Микроводоросли и цианобактерии уже не один десяток лет рассматриваются как важнейшие продуценты кормовой биомассы и других ценных метаболитов для пищевой промышленности, сельского хозяйства и медицины. Тем не менее, как справедливо отмечает диссертант, активное внедрение в практику биологически активных веществ, образуемых этими фототрофами, ограничивается высокой себестоимостью промышленного культивирования микроорганизмов, нестабильностью их роста и низким выходом целевого продукта. В последние годы, благодаря развитию методов генной и клеточной инженерии, позволяющих целенаправленно изменять метаболизм фототрофов, резко возрос интерес к получению не только кормового белка с высокими потребительскими качествами, но и других ценных соединений за счет энергии света с потреблением углекислоты и выделением кислорода. В условиях глобального изменения климата, снижение выброса парниковых газов становится обязательным требованием к промышленным предприятиям биотехнологического профиля. В этой связи перспективным направлением для создания биопроизводств замкнутого цикла считается включение блоков фитореакторов, позволяющих утилизировать углекислоту с

получением продуктов с высокой добавленной стоимостью. Поэтому не возникает сомнения, что междисциплинарные исследования получения биологически активных соединений из микроводорослей и цианобактерий с использованием самых современных методов генной инженерии, структурной биологии и омиксных технологий крайне актуальны, особенно, в условиях активного создания и внедрения на территории РФ новых биотехнологий в рамках импортозамещения.

Научная новизна

Диссертантом выполнен большой объем экспериментальных работ, основанных на глубокой теоретической проработке вопросов, связанных с использованием микроводорослей и цианобактерий в качестве продуцентов кормовой биомассы и ценных метаболитов. В период с 2013 по 2024 гг. автором разработана оригинальная платформа для осуществления скрининга многих штаммов микроводорослей и цианобактерий для целенаправленного поиска продуцируемых этими микроорганизмами биологически активных соединений, имеющих перспективы практического использования. Всего в работе было изучено 160 штаммов микроводорослей и цианобактерий, выделенных из географически разных регионов и предоставленных для исследований разными коллекциями. Изучаемые штаммы охватывали 14 классов микроводорослей и цианобактерий. Выбор коллекционных штаммов основывался на детальной проработке литературных данных с целью поиска штаммов фототрофов из филогенетических линий с уже известными продуцентами ценных для практического использования соединений. В ходе выполнения работ удалось выявить целую серию штаммов микроводорослей – продуцентов коммерчески значимых метаболитов. В частности, получены и охарактеризованы высокоэффективные штаммы-продуценты антиоксиданта фукоксантина, богатой омега-3 эйкозапентаеновой жирной кислоты (ЭПК), а также антибиотика нового класса - этил-3-[(4-метил-пиперазин-1-ил)дiazенил]-1Н-индол-2-карбоксилат, эффективного против метициллин-резистентного золотистого стафилококка. Особо следует отметить, что для поиска биологически активных соединений из микроводорослей и цианобактерий использована технология Онкобокс, которая была разработана при участии диссертанта, но использовалась ранее для предсказания эффективности противоопухолевой терапии на основе данных транскриптома онкопациента. Использование этой платформы открывает новые подходы для масштабного скрининга экстрактов биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов, включающие предсказательную аналитику содержания биологически активных соединений. Таким образом, результаты работы диссертанта позволили выявить и охарактеризовать не только новых эффективных фотосинтезирующих микроорганизмов – продуцентов конкретных биологически активных соединений, но и заложили хорошую базу для целенаправленного ускоренного поиска у разных групп микроорганизмов, причем, по-видимому, не только у фотосинтезирующих, ценных для практического использования метаболитов. Еще один блок работ, который заметно повышает ценность настоящей работы, имеет выраженную практическую направленность и связан с проведением успешных испытаний эффективности корма для мальков тилапии с добавлением биомассы микроводорослей, обогащенной эйкозапентаеновой кислотой. Новизна полученных диссертантом данных подтверждена опубликованием фактического материала в высокорейтинговых профильных журналах, а также получением нескольких патентов.

Достоверность научных положений и выводов работы

Обоснованность полученных результатов подтверждается использованием широкого спектра фотосинтезирующих микроорганизмов, выделенных из различных природных и антропогенных мест обитания, и разработкой четкого плана и последовательности

действий для получения наиболее эффективных штаммов-продуцентов биологически активных соединений.

Достоверность исследований подтверждена большим объемом экспериментальных данных с использованием самых современных физико-химических, микробиологических, биохимических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов, выполненных в нескольких повторах с хорошей статистической обработкой.

Научные положения и выводы диссертационной работы основаны на хорошем знании и анализе современных работ по разнообразию и биотехнологическому использованию фотосинтезирующих микроорганизмов, а также собственному опыту участия в разработке оригинальной модели биотехнологической платформы, позволяющей использовать транскриптомные данные для противоопухолевой терапии. Приведенный список цитируемой литературы включает 566 наименований научных статей и интернет-ресурсов, опубликованных на русском (27) и английском языках (539), причем подавляющее большинство работ издано после 2000 г., что еще раз указывает на большой интерес мировой науки к тематике исследований диссертанта.

Анализ структуры и содержания диссертации, ее завершенность

Диссертация Д.В. Кузьмина носит завершенный характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану и состоит из введения, аналитического обзора литературы, методологии проведения исследований, результатов работы, представленных в виде 5 глав, выводов, заключения, списка использованной литературы и приложения. Работа изложена на 306 страницах, содержит 58 рисунков и 45 таблиц, список литературы насчитывает 566 источников, в том числе на русском языке – 27.

Во «**Введении**» диссертант обосновывает актуальность темы диссертационного исследования, акцентирует внимание на значительном биотехнологическом потенциале фотосинтезирующих микроорганизмов, способных синтезировать широкий спектр соединений с добавленной стоимостью: белков, углеводов, липидов, витаминов, пигментов и др., востребованных в сельском хозяйстве, химической промышленности, энергетике, фармакологии и медицине. Основываясь на сегодняшнем состоянии исследований в области практического использования микроводорослей, соискатель представляет цель и задачи собственных исследований, обозначает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, научные положения, выносимые на защиту.

Глава «**Аналитический обзор. Состояние и перспективы развития биотехнологии фотосинтезирующих микроорганизмов, базирующихся на новых подходах к получению эффективных штаммов-продуцентов соединений с высокой добавленной стоимостью**» состоит из 8 разделов с достаточно подробной информацией о современной систематике микроводорослей, биотехнологического потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов, факторов влияющих на культивирование и выход биомассы, способах мутагенеза, методах генетики и синтетической биологии для повышения эффективности штаммов-продуцентов, а также новых подходах высокопроизводительного скрининга штаммов микроорганизмов на базе технологических платформ. Следует отметить, что большая часть литературных источников представлена зарубежными публикациями в высокорейтинговых изданиях, что повышает своевременность и значимость проведенных диссертантом исследований для развития новых технологий в РФ.

Глава «**Методология проведенных исследований**» включает описание методов культивирования, химического анализа компонентов биомассы (содержание липидов, жирных кислот, белка, фукоксантина, эйкозапентаеновой кислоты и др.), молекулярную идентификацию микроводорослей, используемых в работе, приготовления тестовых кормов на основе биомассы микроводорослей и кормление красной теляпии, а также методов получения и изучения свойств производных антибиотиков на основе триазеноиндола. Еще один блок методических подходов описывает постановку экспериментов для скрининга цитотоксичности экстрактов из биомассы водорослей и цианобактерий, алгоритмы

биоинформатического анализа активации клеточных сигнальных путей при воздействии экстрактов фотосинтезирующих микроорганизмов, выделение и очистку криптофцина-1 из экстракта биомассы цианобактерий. Набор описанных методик указывает на хорошее владение диссертантом как стандартными методами микробиологии и химии, так технологиями анализа большого объема данных с использованием современного программного обеспечения и методов машинного обучения. Всего в работе были изучены 160 штаммов микроводорослей и цианобактерий, полученных из коллекций IPPAS ИФР РАН, ИБ Коми НЦ УРО РАН, ИБВВ РАН, а также отобранных в России, Вьетнаме, Индонезии и Монголии.

Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в следующих 5-ти главах. В **третьей главе**, состоящей из 7-ми подразделов, представлены результаты изучения биотехнологического потенциала выделенных и всесторонне охарактеризованных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов с оптимизацией условий их промышленного культивирования. Каждый подраздел заканчивается выводами, что значительно облегчает восприятие представленного материала с указанием наиболее значимых результатов. На первом этапе был проведен поиск и характеристика штаммов-продуцентов липидов, на основании которого для дальнейшего исследования был выбран штамм одноклеточной коккоидной почвенной зеленой микроводоросли. Морфологические признаки и детальный филогенетический анализ подтвердили принадлежность этой микроводоросли к виду *Bracteacoccus bullatus*. Проведенная серия экспериментов по отработке режимов культивирования этого микроорганизма с оценкой внутриклеточного содержания нейтральных липидов и жирнокислотного профиля позволила сделать вывод, что накопление липидов в определенных условиях превышают известные значения для большинства известных промышленных штаммов и открывают перспективы использования этого штамма для производства биодизеля. Еще один блок работ был направлен на поиск перспективных продуцентов фукоксантина, основным источником промышленного получения которого в настоящее время являются микроводоросли. Скрининг новых изолятов диатомовых и золотистых микроводорослей в сравнении с известным продуцентом фукоксантина – диатомовой водорослью *Paedactylum tricornutum* позволил выявить и охарактеризовать нового пресноводного высокоэффективного продуцента фукоксантина – синуровой водоросли *Mallomonas furtive*, а также с использованием молекулярно-генетического анализа предложить несколько новых таксономических групп этого рода. Исследования микроводорослей класса Eustigmatophyceae из коллекции живых культур ИБ Коми НЦ Уро РАН – известных продуцентов полиненасыщенных жирных кислот, позволили всесторонне охарактеризовать нового пресноводного штамма-продуцента эйкозапентаеновой кислоты с высоким выходом целевого продукта – пресноводной микроводоросли *Vischeria magma*.

В **четвертой главе** представлены результаты исследования возможности использования биомассы выделенных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов в аквакультуре. На сегодняшний момент в качестве добавок к кормам аквакультуры используются, в основном, биомасса цианобактерий рода *Arthrospira* и эукариотические микроводоросли родов *Chlorella* и *Schizochytrium*. В работе были использованы детально исследованные диссертантом штаммы микроводорослей *Mallomonas furtive* и *Vischeria magma*, которые как было показано на ранних этапах исследований, отличались наибольшим содержанием фукоксантина и повышенной концентрацией эйкозапентаеновой кислоты. В качестве тестовой культуры были отобраны мальки красной тилапии, популярной в аквакультуре рыбы, производство которой в мире неуклонно возрастает. Биомассу для кормления нарабатывали в фотобиореакторе по разработанным протоколам с постоянным контролем химического состава биомассы микроводорослей. Установлено, что наибольший эффект на прирост биомассы мальков оказывает стартовый корм с добавлением биомассы *V. magma*, богатой омега-3 эйкозапентаеновой кислотой.

Пятая глава посвящена изучению диссертантом антимикробных веществ, продуцируемых фотосинтезирующими микроорганизмами. В работе проводили целенаправленный поиск антимикробных свойств спиртовых и водных экстрактов биомассы микроводорослей, а также культуральной жидкости. В культуральной жидкости галофильных одноклеточных зеленых микроводорослей *Dunaliella salina*, загрязненной нитчатыми стрептомицетами, была выявлена антимикробная активность против разных грамположительных бактерий. С помощью современных методов ВЭЖХ, УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР-спектроскопии удалось определить химическую формулу вещества, проявляющего антимикробную активность. Вещество относилось к классу триазеноиндолов, для которых ранее не была показана активность против метициллин-резистентного золотистого стафилококка. Диссертантом была проведена большая работа по изучению антимикробных свойств выделенного соединения, обозначенного как BX-S1001. На основании компьютерного моделирования была отобрана и синтезирована 21 модификация исходного вещества путем введения дополнительного атома фтора, различных нитросодержащих заместителей триазенового фрагмента и др. В результате была отобрана модификация, обладающая наибольшей антибактериальной активностью по отношению к восьми клиническим изолятам стафилококка. Исследованные фармакологические особенности этого соединения (BX-S1043), включая стабильность в микросомах печени, в желудочном и кишечном соках, в плазме крови, способность ингибирования цитохромов печени человека, проницаемость и активность транспорта субстанции, проверенная на тест-системе, показатели острой токсичности *in vitro*, дают основание отнести BX-S1043 к третьему классу умеренно опасных веществ с возможностью прямого использования для лечения кожных заболеваний.

В **шестой главе** дается оценка существующих подходов поиска биологически активных соединений, продуцируемых микроводорослями. Диссертантом сделан вывод о том, что текущая организация процесса поиска и исследования новых соединений не совершенна и требует разработки новых подходов, позволяющих в экспресс-режиме определить вероятностную возможность фотосинтезирующего организма образовывать целевые биологически активные вещества.

Для оптимизации поиска биологически активных веществ, продуцируемых микроводорослями, диссертантом была использована технология Онкобокс, которая была разработана непосредственно при участии диссертанта для оценки клинической эффективности существующих лекарственных препаратов для персонализированной терапии онкологических заболеваний. Технология Онкобокс, основанная на результатах анализа мультиомиксного профилирования, была успешно использована для выявления противоопухолевой активности тотальных экстрактов 50-ти про- и эукариотических микроводорослей в экспериментах на модели клеточной линии острого лейкоза (HL-60). Полученные данные показали, что только 5 из 50-ти экстрактов обладали возможным цитотоксическим эффектом в отношении клеточной опухолевой линии, причем при анализе транскриптомных данных наибольшую активность проявлял экстракт цианобактерии *Nostoc sp.*

На следующем этапе провели сравнение результатов, полученных при помощи технологии Онкобокс, с результатами экспериментального определения токсичности экстракта *Nostoc sp.* и подтвердили хорошую корреляцию обоих методов. Оказалось, что действующим веществом экстракта *Nostoc sp.* является пептидный токсин криптофицин-1, оказывающий фунгицидное действие на грибы и дрожжи, а также обладающий противоопухолевой активностью. Полученные результаты позволяют рассматривать технологию Онкобокс как перспективный подход для эффективной предсказательной аналитики присутствия биологически активных веществ в микроводорослях.

В заключительной **главе 7** диссертантом проведен анализ существующих подходов к изучению биотехнологического потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов и

предложена обобщенная исследовательская платформа, включающая набор подходов и протоколов для ускоренного прохождения пути от идентификации нового штамма до выделения целевого соединения, имеющего практическую ценность.

Выводы в диссертационной работе обоснованы и отражают основные полученные результаты в соответствии с поставленными целями и задачами.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Проведенные исследования наряду с фундаментальным вкладом в изучении особенностей метаболизма микроводорослей и цианобактерий имеют явную биотехнологическую направленность поиска наиболее ценных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов в качестве кормовой добавки для аквакультуры за счет высокого содержания в биомассе липидов, жирных кислот, белка, фукоксантина и эйкозапентаеновой кислоты. Не менее значимые результаты для биотехнологии были получены диссертантом при целенаправленном скрининге антимикробных веществ, продуцируемых микроводорослями и цианобактериями. Особо следует отметить, что в ходе проведения работы Д.В. Кузьмину удалось выделить, очистить, определить химическую формулу антибиотика, отобрать и синтезировать 21 модификацию исходного вещества и получить новую субстанцию, обладающую наибольшей антибактериальной активностью по отношению к восьми клиническим изолятам стафилококка. Многолетний опыт работы Д.В. Кузьмина по участию в разработке технологии Онкобокс для персонализированной терапии позволили успешно адаптировать эту исследовательскую платформу для поиска биологически активных веществ, продуцируемых микроводорослями, а также сформулировать основные принципы ускоренного прохождения пути от идентификации нового штамма до выделения целевого соединения, имеющего практическую ценность. На наш взгляд, технология Онкобокс может найти широкое применение при поиске биологически активных веществ, продуцируемых разными группами живых организмов.

Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научной печати.

Материалы диссертационной работы полностью отражены в автореферате. Список публикаций по теме диссертации включает 9 печатных работ, опубликованных в высокорейтинговых профильных изданиях (3 в журналах Q1 и 6 – в Q2), 1 глава в монографии и 3 патента РФ.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Содержание автореферата в полной мере отражает основные идеи, этапы и выводы диссертационной работы, которые прошли международную экспертизу и отражены в публикациях автора в ведущих международных изданиях, а также доложены на российских и международных конференциях.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы.

Диссертационная работа Д.В. Кузьмина носит заверченный характер, представленный материал хорошо структурирован и проиллюстрирован в виде таблиц, графиков, диаграмм и рисунков, что облегчает восприятие большого экспериментального материала. Литературный обзор, а также постоянное сопоставление собственных экспериментальных данных с литературными данными указывает на хорошее знание диссертантом современных исследований по сходной тематике. Сочетание самых современных методов исследований с использованием необходимого количества повторов и статистической обработки полученных данных подтверждают достоверность и обоснованность представленных результатов.

Недостатки диссертационной работы.

1. В целом следует отметить, что диссертационная работа и автореферат написаны хорошим языком, но встречаются единичные погрешности стилистического характера и опечатки.
2. Часть рисунков имеет подписи на английском языке, следовало бы все привести к единому формату.
3. Не совсем понятно, зачем после выводов диссертант включил еще короткий раздел «Заключение», который фактически повторяет обобщения, сделанные в конце раздела 7.
4. Работа посвящена изучению микроводорослей и цианобактерий, но в литературном обзоре дается обзор и краткая систематика только эукариотических микроводорослей.
5. Антимикробная активность бала показана в культуральной жидкости микроводоросли *Dunaliella salina*, растущей вместе с бактерией *Streptomyces* sp. Не совсем понятно, почему диссертант уверенно приписывает антимикробную активность только микроводоросли, а не рассматривает присутствующую бактерию?
6. Почему патент, полученный по результатам работы, включает штамм *Mallomonas kalinae*, а не описанный в работе штамм *Mallomonas furtive*?
7. Работа включает большой экспериментальный материал, поэтому хотелось бы увидеть более высокую публикационную активность диссертанта.
8. В выводе 3 помимо характеристик штамма-продуцента *Vischeria magna* приведены еще и общие рассуждения о полезности свойства пресноводности этой водоросли, что в выводах не вполне уместно.

Высказанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы

Результаты работы рекомендуются к использованию в учебных курсах для студентов и аспирантов ВУЗов России по специальности микробиология, молекулярная биология и биотехнология.

Заключение.

Диссертация Д.В. Кузьмина является завершенной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, развивающей представления о биотехнологическом потенциале микроводорослей и цианобактерий как перспективных продуцентов многих биологически активных веществ. Значимым достижением для развития аквакультуры в РФ стала разработка и успешное испытание корма для мальков тилпии на основе биомассы микроводорослей, обогащенной липидами, омега-3 жирными кислотами и фукоксантином. Большим биотехнологическим потенциалом обладает адаптированная к исследованиям возможностей микроводорослей и цианобактерий продуцировать антимикробные соединения платформа Онкобокс, позволяющая значительно сократить поиск потенциальных продуцентов целевых метаболитов, имеющих практический интерес. Такая платформа может быть использована не только для фотосинтезирующих организмов, но и для поискового скрининга других групп организмов – потенциальных продуцентов биологически активных веществ.

Диссертационная работа Кузьмина Дениса Владимировича «Разработка платформы по получению биологически активных соединений из фотосинтезирующих микроорганизмов», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, по актуальности, научной новизне, методическим подходам и решениям поставленных задач с использованием самых современных достижений омиксных технологий, теоретической и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор Кузьмин Д.В. заслуживает присуждения ученой степени доктора наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Диссертационная работа и автореферат обсуждены, отзыв заслушан и одобрен на совместном научном семинаре лаборатории реликтовых микробных сообществ и отдела молекулярной биологии микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН (Протокол № 02 от 14.02.2025 г.).

Зам. директора ФИЦ Биотехнологии РАН,
зав. лабораторией реликтовых микробных
доктор биологических наук

Н.В. Пименов

Зам. директора ФИЦ Биотехнологии РАН,
зав. отделом молекулярной биологии микроорганизмов
доктор биологических наук, профессор

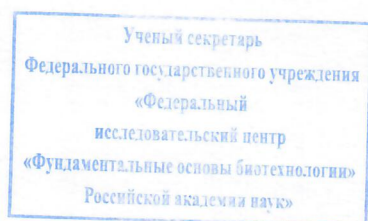
Н.В. Равин

Т

Адрес ведущей организации: Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», Юридический адрес: 119071 Российская Федерация, г.
Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Тел.: +7 (495) 954-52-83

Факс +7 (495) 954-27-32, эл. почта: info@fbras.ru, <http://fbras.ru>



10рловская А.Ю.

