

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, заведующего лабораторией адаптации микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)» Меденцева Александра Григорьевича на диссертационную работу Кузнецова Дениса Бахтиеровича на тему: «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы диссертационного исследования

Обеспечение фармацевтического рынка необходимым количеством лекарственных средств стало возможно благодаря использованию технологии рекомбинантной ДНК. Действующие вещества лекарственных средств, получаемых с помощью технологии рекомбинантной ДНК, представляют собой преимущественно белки, пептиды, а также их производные. Для их получения рекомбинантную ДНК встраивают в клетки, которые их продуцируют. Наиболее широко используемым микроорганизмом, использующийся в качестве продуцента является *Escherichia coli*. В технологии производства биотехнологических препаратов, получаемых на основе рекомбинантных микроорганизмов, выделяют два основных этапа upstream process и downstream process. Для осуществления upstream process и повышения его эффективности в настоящее время используются и постоянно совершенствуются аппаратно-программные комплексы на основе биореакторов. С распространением и удешевлением электронных компонентов все больше различных технических и технологических решений внедряются в эту область. В связи с этим диссертационная работа Кузнецова Дениса Бахтиеровича «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов» является актуальным направлением исследования, способным повысить эффективность существующих и будущих биотехнологических производств.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В результате данной работы автором разработан метод повышения выхода биомассы *E. coli* с помощью микроволнового облучения, включающий обработку культуры с однородной плотностью потока мощности на частоте 36,84÷37,04 ГГц в режиме непрерывной генерации, продолжительностью 25±5 мин, концентрацией, при которой необходимо проводить облучение 1200±240 млн кл/мл, температуре 37±1 °С. Данный метод может быть применен во всех этапах *upstream process*.

Впервые разработан эффективный метод восстановления индикаторных свойств цельноклеточного биосенсора на основе *E. coli* с *lux*-опероном. Данный метод заключается в воздействии определенной частотой, мощностью и продолжительностью СВЧ-облучения на биосенсор. Эффективность данного метода была подтверждена в способе определения антагонистической активности пробиотиков.

Впервые изучено влияние метода повышения выхода биомассы *E. coli* с помощью микроволнового облучения на продукцию рекомбинатных белков на примере люциферазы. В результате проведенного исследования установлено, что оптимальные параметры облучения не приводят к потере плазмиды и снижению их биосинтеза.

Впервые с использованием методов математического планирования и оптимизации условий проведения эксперимента определены параметры продолжительности облучения и концентрации клеток, при которых культивирование штамма *E. coli* является наиболее эффективным для увеличения прироста биомассы и продукции целевого белка.

В результате проведенного исследования полученные данные обрабатывались с использованием современных математических инструментов, установлены прогнозирующие переменные и разработаны математические модели, которые позволяют прогнозировать требуемый результат, что соответствует требованиям GMP при внедрении новых технологических процессов в производство. Также впервые представлена интерпретация механизмов влияния электромагнитного излучения на

метаболическую активность, бактериальную люминесценцию и изменение ростовых характеристик бактериальной культуры на основе изученных физико-химических процессов, протекающих при СВЧ-облучении с позиции химии поверхности.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертационной работы Кузнецова Д.Б. обусловлена использованием современных биологических, физических и физико-химических методов, большим объемом экспериментальных данных и их корректной статистической обработкой.

Положения, выносимые на защиту, аргументированы, выводы подтверждены экспериментальными данными и научно обоснованы, соответствуют содержанию работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Разработанные в рамках данной работы метод оптимизации upstream process и концепты технических решений для их осуществления открывают новые возможности для повышения эффективности биотехнологических предприятий, в т.ч. занимающиеся выпуском лекарственных средств. Разработанный метод повышения концентрации клеток при культивировании *E. coli* позволяет увеличить прирост биомассы штамма *E. coli* K12 TG1 до 64% и штамма *E. coli* LEGM-18 до 81%.

Особый практический интерес представляют собой разработанная методика интенсификации роста реакторной культуры с использованием предложенной технологической схемы и блок-схемы биореактора, которая может быть использована фармацевтическими предприятиями для повышения маржинальности производства социально-значимых лекарств, цены на которые регулируются правительством.

Значимым практическим результатом работы является доказанная возможность использования разработанной методики восстановления индикаторных свойств цельноклеточных биосенсоров в методе оценки антагонистической активности пробиотических штаммов. В связи с этим разработанная методика восстановления/усиления индикаторных свойств рекомбинантного штамма *E. coli* внедрена в практическую деятельность

фармацевтической компании АО «НПО Микроген» филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

По теме диссертации Кузнецова Д.Б. опубликовано 18 научных работ, из которых 10 статей в рецензируемых изданиях, 4 статьи – в других изданиях, 4 тезиса – в материалах конференций.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы

Автор сформулировал цель и задачи исследования, проведена значительная часть лабораторных исследований, разработан метод повышения концентрации бактериальной культуры с помощью СВЧ-облучения, выполнено обобщение всех результатов экспериментальной работы и проведена статистическая обработка данных.

Оценка содержания, завершённости и оформления диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка используемой литературы. Общий объем диссертации, включая 13 таблиц и 35 рисунков, составляет 117 страниц. Список литературы состоит из 50 отечественных и 151 зарубежных источников.

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, представлены материалы исследования, описаны основные методы исследования.

Первая глава освещает основные продукты, которые получают с использованием *E. coli*, в том числе различные витамины, аминокислоты, ферменты, и широкий спектр лекарственных препаратов, включая пробиотические, иммуномодулирующие и противоопухолевые. Приводится описание цельноклеточных биосенсоров и их использование в определении влияния электромагнитного излучения. Представлено современное состояние развития технологий электромагнитного облучения культур

микроорганизмов, приведены известные изобретения в этой области, а также различные эффекты, возникающие при СВЧ-облучении.

Во второй главе автор описывает методы облучения и устройства для их реализации, результаты исследований влияния СВЧ-излучения на питательную среду методами молекулярной абсорбционной спектроскопии в УФ-области, ядерной магнитно-резонансной релаксометрии, рефрактометрии. Также приводятся данные сканирующей атомно-силовой микроскопии интерфейсов клеток *E. coli*, изучение люминесценции биосенсора под воздействием различных параметров электромагнитного излучения.

Третья глава посвящена разработке технологии интенсификации роста культуры *E. coli*. Представлены известные методы оптимизации и место микроволнового нетеплового облучения. Приведены данные исследования параметров накопления биомассы и продукции ею рекомбинантных белков при варьировании различных переменных, а также связи параметров ядерной магнитно-резонансной релаксометрии с интересующим биотехнологическим эффектом. Приведены результаты полного факторного эксперимента и построена карта уровня прироста биомассы в зависимости от переменных и профили для предсказанных значений. Приведено описание технологии получения биомассы, концепты устройств и описание их работы, а также технологическая схема получения биомассы.

Выводы обоснованы и подтверждены полученными результатами. Сформулированы практические рекомендации, которые важны для отечественной биотехнологии.

Автореферат отражает основное содержание диссертации, иллюстрирован рисунками и таблицами, которые описывают значимые результаты работы.

Обобщая сказанное, можно отметить, что представленная работа является исследованием, обладающим новизной, выполненным в целом корректно и на высоком методическом уровне, результаты которого

представляют собой практический интерес, что дает возможность сделать заключение о высоком уровне научной и профессиональной подготовки соискателя.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, объектам исследования, основным положениям и выводам, сформулированным автором, диссертация полностью соответствует специальности 1.5.6. – биотехнология.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие замечания:

- в обсуждении результатов работы не приведены обоснования использования конкретных частот микроволнового диапазона для процесса повышения концентрации бактериальной культуры;

- в работе не была показана возможность применения разработанной технологии при получении большого объема биомассы.

Отмеченные замечания не носят принципиального характера и не снижают положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

В Диссертационной работе Кузнецова Дениса Бахтиеровича на тему «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов» представлено новое решение актуальной задачи – разработка новой технологии повышения эффективности процессов получения бактериальной биомассы. Диссертационная работа Кузнецова Дениса Бахтиеровича, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – биотехнология, выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Миронова Андрея Юрьевича, является законченной научно-квалификационной работой, которая по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации «842 от 24 сентября 2013 года (с редакции Постановлений Правительства Российской Федерации (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства

Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016, № 748 от 02 августа 2016, № 650 от 29 мая 2017, № 1024 от 28 августа 2017, № 1168 от 01 октября 2018, № 426 от 20 марта 2021, № 1539 от 11 сентября 2021, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26 мая 2020), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Кузнецов Денис Бахтиерович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.6. – биотехнология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук» (142290, Московская область, г. Пушкино, пр-кт Науки, 5; Телефон: +7-915-063-10-11, e-mail: medentsev-ag@rambler.ru)

25.12.2022

доктор биологических наук

Александр Григорьевич Меденцев

Подпись А.Г. Меденцева заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук» (142290, Московская область, г. Пушкино, пр-кт Науки, 5; Телефон: +7-(4967) 73-08-44, e-mail: tta@ibpm.pushchino.ru

доктор биологических наук



Татьяна Анатольевна Решетилова