

УТВЕРЖДАЮ

директор ММБИ РАН



д.б.н. Г.Р. Макаревич

«26» июля 2021 г.

ОТЗЫВ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Мурманского морского биологического институт Российской академии наук
(ММБИ РАН)

на диссертацию Железновой Светланы Николаевны
«Продукционные и биохимические характеристики диатомовой водоросли
Cylindrotheca closterium (Ehrenberg) Reimann et J.C. Lewin 1964»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.10 – “Гидробиология”.

Получение биологически активных веществ (БАВ), используемых в медицине и пищевой промышленности, из представителей морской флоры и фауны является в настоящее время одним из самых востребованных и бурно развивающихся направлений прикладной гидробиологии. Исследования в этой области ведутся постоянно, и с каждым днем появляются новые биотехнологические разработки, обогащающие людей средствами, обладающими гипотензивными, антибактериальными, противогрибковыми, противоопухолевыми, радиопротекторными, иммуномодулирующими, антиоксидантными и другими полезными свойствами.

Также неуклонно пополняется список организмов, служащих источником столь важных для человека продуктов. Одному из них – планктонной микроводоросли *Cylindrotheca closterium* – посвящена представленная диссертация Светланы Николаевны Железновой.

Актуальность данной работы в первую очередь обусловлена преимущественно прикладной направленностью проведенного исследования. Использование диатомовых водорослей как сырья для получения фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), а также белков, макро- и микроэлементов, требуют досконального знания биологии, физиологии и биохимии организмов, являющихся потенциальными объектами культивирования. Для выбранного автором в качестве такового вида *C. closterium* потребовалось изучение продукционных и биохимических характеристик в накопительном и проточном режимах выращивания с целью определения основных характеристик субстратзависимого роста и биосинтеза ценных веществ, а также оптимизации условий культивирования для получения биомассы с высокой концентрацией последних.

Практическая значимость диссертации, конечно же, очевидна. Проведенный С.Н.Железновой подробный анализ имеющихся публикаций по теме позволил выявить существенные недостатки применяемого накопительного режима культивирования *C. closterium* на обедненных питательных средах, не позволяющих получить плотную культуру и не дающих возможности понять физиологические механизмы биосинтеза ПНЖК и фукоксантина. Автором подобраны оптимальные условия выращивания диатомеи методом двухступенчатого проточного культивирования на сбалансированной по биогенным элементам питательной среде для получения биомассы с высоким содержанием требуемых продуктов. Показано, что микроводоросль обладает значительным потенциалом для создания полупромышленной технологии получения фукоксантина и ПНЖК. Из биомассы *C. closterium* разработаны различные лечебно-профилактические добавки.

Что касается **теоретической значимости** работы, она заключена во всестороннем рассмотрении биохимических процессов, протекающих в клетках водоросли. Определены потребности исследуемого организма в основных биогенных элементах. Рассчитаны такие важные физиологические характеристики, как максимальная удельная скорость субстратзависимого роста и константа насыщения при лимитировании роста кремнием.

Научная новизна выполненных исследований содержится в следующих ключевых выводах.

1. Разработана новая питательная среда для плотной культуры диатомовой водоросли *C. closterium*. Установлено, что организм может расти и вегетировать при высоких концентрациях нитрита, а добавление в питательную среду азота в аммонийной форме во время активного роста водоросли приводит к ингибированию всех процессов метаболизма и в конечном итоге к гибели культуры.

2. Определены оптимальные параметры технологии выращивания *C. closterium*. Выявлены диапазоны температуры, pH и поверхностной облученности, наиболее благоприятные для роста водоросли и биосинтеза фукоксантина и ПНЖК.

3. Установлена линейная связь между массовыми долями фукоксантина и общих липидов в биомассе *C. closterium* при различных условиях культивирования.

4. Впервые проведены исследования проточной культуры микроводоросли в двухступенчатом хемостате. Разработаны новые технологии получения целевых продуктов лечебно-профилактического назначения из биомассы и БАВ *C. closterium*, защищенные патентами РФ.

В качестве **положений, выносимых на защиту**, автором предлагаются такие важнейшие результаты проведенного анализа, как обнаруженная пропорциональность скоростей синтеза фукоксантина и суммарных липидов в клетке, а также разобщенность во времени процессов роста и синтеза биологически активных веществ. Второй феномен обуславливает

необходимость использования двухступенчатого проточного культивирования для получения биомассы микроводоросли с высоким содержанием фукоксантина и ПНЖК. Кроме этого, убедительно показано, что в питательных средах, используемых в настоящее время для выращивания *C. closterium*, соотношения биогенных элементов не являются оптимальными для ее интенсивного воспроизводства.

Краткая характеристика диссертации.

Представленная работа содержит 212 страниц машинописного текста и состоит из Введения, 5 глав, Заключения, Выводов, перечня сокращений и условных обозначений, а также списка использованной литературы (291 наименования, в т.ч. 232 иностранных). Диссертация включает 19 таблиц и 64 рисунка.

Введение к работе в основном имеет традиционную композицию и содержит обоснование актуальности исследований, их цель и задачи, уровень разработанности данной темы, положения, выносимые на защиту. Даны описание научной новизны, теоретической и практической значимости работы и апробации полученных результатов, степень их достоверности. Указаны сведения об объеме и структуре диссертации, личный вклад и публикации автора по ее теме, перечислены благодарности.

Глава 1 «Продуктивность и биохимический состав диатомовых водорослей (литературный обзор)» представляет собой развернутый, но при этом очень подробный, анализ большого количества публикаций, посвященных вопросам происхождения, физиологии и биохимии рассматриваемой группы одноклеточных водорослей. Конкретно для вида *C. closterium* С.Н.Железновой тщательно разобраны жизненный цикл, морфология и ультраструктура клетки, состав пигментов, липидов, запасных веществ, макро- и микроэлементов. Отдельным пунктом рассматриваются изменения метаболизма и синтеза фукоксантина, липидов и жирных кислот при различных условиях культивирования.

Глава 2 «Материалы и методы исследования» содержит описание лабораторной установки и способа выращивания альгологически чистой культуры *C. closterium*. Детально изложены методы измерения плотности культуры и биомассы путем прямого взвешивания и мокрого сжигания. Подробно расписана методика определения биохимических компонентов клеток микроводоросли, а именно: белка, общих липидов, углеводов, фукоксантина и жирных кислот, а также биогенных элементов и тяжелых металлов. Приводятся методы статистической обработки полученных результатов.

В Главе 3 «Производственные характеристики диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*» последовательно излагается ход экспериментов по определению потребностей микроводоросли в азоте, фосфоре и кремнии, а также оптимальных режимов освещенности и температуры. Основным результатом этого исследования стала разработка новой питательной среды RS для интенсивного культивирования *C. closterium* с необходимыми и достаточными концентрациями всех биогенных элементов. Показаны положительные стороны проточной культуры микроводоросли по сравнению с накопительной; продемонстрированы высокие производственные показатели вида при выращивании в двухступенчатом хемостате при оптимально подобранной скорости потока. В проточной культуре продуктивность *C. closterium* оказывается выше в 2,2 раза, чем в периодической.

В Главе 4 «Биохимический состав диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* при различных условиях культивирования» также проводится сравнение накопительного и проточного режимов выращивания, но уже в плане синтеза БАВ: фукоксантина, белков, углеводов, липидов и жирных кислот. Список последних включает 15 наименований, определение их концентраций осуществлялось на каждой фазе роста. Подчеркивается, что важным преимуществом проточного культивирования является возможность достижения оптимальных условий среды для роста клеток и биосинтеза ценных веществ, что обеспечивает постоянство биохимического состава

получаемой биомассы. В тех случаях, когда процессы роста и накопления БАВ разобщены, используется двухступенчатый хемостат: в нем максимальные уровни искомым веществ превосходят в 2,4 раза аналогичные показатели при накопительном режиме выращивания микроводоросли.

Наконец, Глава 5 «Разработка технологий получения целевых продуктов из диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*» полностью посвящена технологическому аспекту работы. Здесь представлены ее практические результаты, подкрепленные патентами, и они, прямо скажем, впечатляют. Приведены регламенты хранения микроводоросли без потери полезных свойств. Разработан и запатентован новый биологически активный продукт без спирта – растительное масло, насыщенное фукоксантином; он характеризуется хорошими органолептическими показателями – приятным вкусом и ароматом. Предложена полупромышленная технология получения фукоксантина в кристаллической форме из биомассы культивируемого организма. В связи с отсутствием в настоящее время промышленных установок по выращиванию морских бентосных микроводорослей, разработана технология интенсивного культивирования диатомеи *C. closterium* с использованием газовыхревого фотобиореактора, работающего по принципу «торнадо». Она позволила достичь продуктивности, превышающей в 3-4 раза показатели для других систем культивирования.

В кратком Заключении резюмируется содержание проведенных исследований, и перечисляются их основные итоги.

Выводы, в количестве 6 пунктов, сделанные автором, достаточно убедительны и в должной мере соответствуют поставленным задачам.

В целом структура диссертации и содержание глав полностью отражают сформулированные автором **цель и задачи исследования**.

Ну а главным достоинством представленной работы, конечно же, следует признать безукоризненную подготовку и выполнение экспериментов. В чем состоит основная проблема при выращивании микроводорослей? – в природе не существует монокультур! Каждый организм является

компонентом сложного фитоценоза, обычно содержащего большое количество форм, и занимает в нем строго определенное место. Будучи изолирован от остальных, вид ведет себя совершенно по-другому, часто совсем иначе реагируя на факторы среды. В этом плане с гетеротрофами работать проще: им в значительной степени безразлично, что использовать в пищу и с кем за нее бороться – со «своими» особями или с «чужими» (вследствие чего возникает знаменитый «парадокс планктона»). Для автотрофных организмов ситуация намного сложнее: в конкуренции за солнечный свет и биогенные элементы определяющую роль играют конкретный пигментный состав и особенности биохимических реакций в клетке. В итоге динамика развития вида, которая наблюдается в природе, очень сильно отличается от таковой при его культивировании. Всё приходится изучать «с нуля»: влияние каждого фактора, изменения каждого показателя. И с этими трудностями С.Н.Железнова блестяще справилась!

Высокий уровень **обоснованности и достоверности** полученных результатов не вызывает сомнений и обеспечивается грамотной схемой постановки многочисленных экспериментов, обширным объемом данных, полученных с применением современных методических приемов и проанализированных с помощью грамотно использованных статистических методов, а также представленностью основных итогов исследований на международных и всероссийских научных конференциях.

Личный вклад автора.

С.Н.Железнова лично участвовала в постановке экспериментов по накопительному и проточному режимам культивирования *C. closterium*. Ею же самостоятельно выполнены обработка, интерпретация и обобщение полученного материала, были поставлены задачи и сформулированы выводы, автор принимал участие в обсуждении результатов и написании совместных статей. Диссертационная работа написана лично соискателем.

Количество и характеристика публикаций. Материалы исследований по теме опубликованы в 35 печатных работах, из которых 8 – в

российских и международных научных журналах, включенных в перечень ВАК, в т.ч. 3 патента; 5 статей входят в базу SCOPUS, 19 работ включены в сборники материалов и тезисов международных конференций.

Автореферат дает полное представление о содержании диссертации.

Критические замечания по работе.

Не в плане критики, а скорее в качестве рекомендации считаем необходимым обратить внимание на следующий момент, слабо отраженный в диссертации: чем был обусловлен выбор в качестве объекта исследования именно диатомеи *Cylindrotheca closterium*? Ведь источником перечисленных биологически активных веществ могут служить и служат многие другие группы организмов. Так, фукоксантин является важнейшим компонентом пигментной системы золотистых и особенно бурых водорослей, из которых его в настоящее время и добывают. Хотелось бы знать, какие именно преимущества имеет в этом отношении *C. closterium*: она более всего подходит для выращивания? подобранный для нее режим культивирования требует меньших затрат? или оптимален сам процесс получения из биомассы этого вида необходимых продуктов? При внедрении данной разработки в промышленное производство все эти вопросы неминуемо возникнут.

Однако высказанное замечание касается уже дальнейших перспектив выполненного исследования и ни в коей мере не умаляет значимости представленной работы и высокой оценки, которую заслуживает ее автор.

Общее заключение по диссертации.

Защищаемая работа С.Н. Железновой «Продукционные и биохимические характеристики диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et J.C. Lewin 1964», вне всякого сомнения, является завершенным научным трудом, вносящим существенный вклад в прикладную гидробиологию.

Диссертация полностью удовлетворяет требованиям пп. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., соответствует

заявленной специальности, а ее автор, **Железнова Светлана Николаевна**, безусловно, заслуживает присуждения искомой ученой степени – кандидата биологических наук по специальности 03.02.10 – “Гидробиология”.

Отзыв ведущей организации подготовлен доктором биологических наук, профессором, директором ММБИ РАН Макаревичем Павлом Робертовичем и кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории планктона ММБИ РАН Ларионовым Виктором Витальевичем, рассмотрен и утвержден («за» – 15, «против» – нет, «воздержался» – нет) на заседании Ученого совета ММБИ КНЦ РАН (протокол № 1 от 12 марта 2021 г.).

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Мурманского морского биологического институт Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор



Павел Робертович Макаревич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Российской академии наук (ММБИ РАН)

183010, г. Мурманск, ул. Владимирская, 17

телефон: 8(8152) 25-39-63

e-mail: makarevich@mmbi.info

Старший научный сотрудник лаборатории планктона Федерального государственного бюджетного учреждения науки Мурманского

морского биологического институт Российской академии наук,
кандидат биологических наук



Ларионов Виктор Витальевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский
морской биологический институт Российской академии наук (ММБИ РАН)

183010, г. Мурманск, ул. Владимирская, 17

телефон: 8(8152) 23-95-55

e-mail: larionov@mmbi.info

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ *П.Р. Макаревича*
и В.В. Ларионова УДОСТОВЕРЯЮ
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ ММБИ РАН
К. Х. Н. **Н. Е. КАСАТКИНА** *Касаткина*

