

УТВЕРЖДАЮ

И.о. ректора

первый проректор учреждения образования
«Белорусский государственный технологический университет»



А.А. Сакович

10 июня 2025 г.

О Т З Ы В

ОППОНИРУЮЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Винтер Маргариты Андреевны «Разработка биотехнологического способа получения циклического 3',5'-диаденозинмонофосфата и его наноконплексов с хитозаном», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Соответствие содержания диссертации заявленной специальности и отрасли науки.

Диссертационная работа Винтер Маргариты Андреевны представляет собой законченное квалификационное исследование, посвященное:

- конструированию рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента диаденилатциклазы, пригодной для биокаталитического получения цикло-диАМФ;
- разработке биотехнологического способа получения цикло-диАМФ;
- конструированию рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента полисахариддеацетилазы, пригодной для трансформации хитина в хитозан;
- разработке биотехнологического способа получения хитозана;
- получению и характеристике наночастиц на основе хитозана, содержащих в качестве «гостевой» молекулы цикло-диАМФ.

Тема представленной диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 № 156 п. 2 «Биологические, химические, медицинские и фармацевтические технологии и производства: переработка сырья, лесохимия.

Согласно объектам и предмету исследования, поставленной цели, задачам и методам, используемым для их решения, а также представленным к защите и обсуждению результатам, диссертационная работа Винтер М.А. полностью соответствуют отрасли «биологические науки» и специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в соответствии с паспортом указанной специальности по следующим пунктам областей исследования:

3. Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения.

9. Технология рекомбинантных ДНК, гибридная технология. Биотехнология животных клеток, иммунная биотехнология.

Работа представлена в Совет по защите диссертаций Д 01.34.01 при Государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси».

Научный вклад соискателя в решение научной задачи с оценкой его значимости.

В настоящее время главенствующей тенденцией стало стремление заменить экологически небезопасные химические технологии при получении различных целевых продуктов на сравнительно безвредные биологические процессы. Важная роль при этом отдается ферментам-катализаторам, получаемым при помощи так называемой технологии рекомбинантной ДНК.

Одним из важных вариантов этой технологии рассматривается создание рекомбинантных штаммов-продуцентов ферментов, способных катализировать реакции с высокой специфичностью и селективностью, а также высоким выходом образования искомого продукта.

Винтер М.А. создан рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, который продуцирует диаденилатциклазу *Bacillus thuringiensis*, пригодной для биокаталитического получения цикло-диАМФ. Продукция этого фермента в виде каталитически активных телец включения позволяет их использовать до 10 раз без значительной потери каталитической активности.

Созданная новая технология получения цикло-диАМФ с использованием каталитически активных телец включения позволяет получать до 100 мг цикло-диАМФ за 1 технологический цикл.

Создан рекомбинантный штамм *E. coli*, который продуцирует полисахарид-деацетилазу *B. licheniformis*, которая впервые была применена для синтеза хитозана.

Соискатель экспериментально обосновал возможность использования полисахариддеацетилазы для получения хитозана и хитоолигосахаридов.

Впервые получены наноконплексы хитозана и цикло-диАМФ, которые способны высвобождать цикло-диАМФ в окружающую среду рН-зависимым способом.

Конкретные научные результаты (с указанием их новизны и практической значимости), за которые соискателю может быть присуждена искомая ученая степень.

В соответствии с поставленной целью и задачами соискатель создал штамм *E. coli* ДАЦ-22 – продуцент полноразмерной ДАЦ *B. thuringiensis*, продуцирующая способность которого в отношении целевого фермента составила 720 ед/л КЖ. В оптимизированных условиях культивирования продуцирующая способность достигает 1004 ед/л КЖ.

Разработана технология получения цикло-диАМФ, предусматривающая трансформацию АТФ в целевой продукт под действием рекомбинантной ДАЦ в составе телец включения, которые могут быть использованы повторно до 10 раз.

Соискателем получен штамм-продуцент полисахариддеацетилазы. Данный фермент был впервые применен для получения хитозана – соединения, имеющего перспективу для использования в пищевой промышленности, биотехнологии и

медицине. Показана возможность использования фермента в качестве биокатализатора в водно-буферной и двухфазной системах.

Разработана методика определения концентрации хитозана с помощью конго красного а также метод выделения хитозана из реакционной смеси с получением сухого порошка.

Наконец, методом ионного гелеобразования впервые синтезированы и охарактеризованы наноразмерные комплексы хитозан:цикло-диАМФ. Установлено рН-зависимое высвобождение цикло-диАМФ из комплексов с хитозаном, что свидетельствует в пользу возможности использования нанок комплексов хитозан:цикло-диАМФ в качестве рН-контролируемой пассивной системы доставки данного соединения в клетки-мишени

Все перечисленное выше указывает на то, что диссертационная работа Винтер М.А. имеет несомненное научное и практическое значение. Результаты диссертации должны стимулировать дальнейшие усилия по получению новых промышленно ценных ферментов.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.

Представленные в диссертации результаты получены Винтер М.А. лично или при непосредственном участии под руководством доктора биол. наук, чл.-корр. НАН Беларуси, профессора А.И. Зинченко. Качественный обзор литературы с убедительным обоснованием актуальности проведения исследований в выбранном направлении и использованная для решения поставленных задач адекватная методическая база характеризует соискателя как исследователя, всесторонне подготовленного в сфере микробной биотехнологии. В пользу высокого уровня подготовки соискателя в области биотехнологии свидетельствует четкая и логическая интерпретация результатов экспериментов, которые прошли винушительную апробацию на международных научных конференциях.

Выводы, сформулированные на основе полученных и статистически обработанных результатов, аргументированы ссылками на публикации автора в рецензируемых научных изданиях и не вызывают сомнения.

Рецензируемая диссертация представляет собой целостный, заверченный научный труд, в котором на высоком теоретическом и методическом уровне решены все поставленные задачи. Результаты диссертации изложены в 10 научных публикациях, в том числе 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, 2 статьях в материалах конференций, тезисах 2 докладов, 1 патенте Республики Беларусь и 1 учебно-методическом пособии.

Все результаты и положения, выносимые на защиту, нашли отражение в публикациях. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Диссертация написана хорошим научным языком и оформлена согласно требованиям ВАК Беларуси.

Все отмеченное выше подтверждает соответствие научной квалификации Винтер М.А. ученой степени кандидата биологических наук.

Замечания и вопросы к соискателю.

Недостаточно обсуждены в диссертации перспективы практического использования цикло-диАМФ, хитозана и хитоолигосахаридов.

На рисунке 4.4 некорректно подписана ось ординат. Также название рисунка 4.5 не отражает его содержание, а описание результатов масс-спектрометрического анализа интерпретированы некорректно.

В заключении в пункте 2. присутствует ссылка на приложения Г, Ж, хотя в остальных пунктах такие ссылки отсутствуют.

В автореферате диссертации в разделе «Резюме» не перечислены все методы исследований, использованные при получении результатов.

Следует подчеркнуть, что сделанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют высокого качества работы в целом.

Заключение.

Таким образом, диссертационная работа Винтер М.А. представляет собой актуальное в теоретическом и практическом отношении законченное квалификационное исследование, содержащее оригинальный экспериментальный материал. Работа по теоретическому и методическому уровню выполнения, объему проведенных исследований и значимости полученных результатов отвечает требованиям, предъявляемым ВАК Беларуси к кандидатским диссертациям.

Руководствуясь п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, считаем, что автору диссертационной работы «Разработка биотехнологического способа получения циклического 3',5'-диаденозинмонофосфата и его нанокмплексов с хитозаном» Винтер Маргарите Андреевне может быть присуждена ученая степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) за совокупность новых научно обоснованных экспериментальных данных, включающих:

- создание рекомбинантного штамма *E. coli* ДАЦ-22 – продуцента полноразмерной ДАЦ *B. thuringiensis* с высокой продуцирующей способностью в отношении целевого фермента.
- разработку уникальной технологии синтеза цикло-диАМФ, предусматривающую наработку биомассы клеток *E. coli* ДАЦ-22, выделение из нее каталитически активных телец включения и их использование для трансформации АТФ в целевой продукт, позволившая получать порядка 100 мг цикло-диАМФ за один технологический цикл.
- создание рекомбинантного штамма *E. coli* bPDAB – продуцента полноразмерной ПДА *B. licheniformis*, который характеризуется высоким уровнем синтеза целевого продукта ($38,68 \pm 2,50$ ед/л культуральной жидкости).
- синтез наноразмерных (200–250 нм) комплексов хитозана, содержащих цикло-диАМФ, способных высвобождать цикло-диАМФ в окружающую среду рН-зависимым способом,

что в совокупности вносит существенный вклад в развитие молекулярной биотехнологии продуцентов хозяйственно-важных ферментов.

Отзыв составлен на основе всестороннего анализа материалов представленной диссертационной работы и устного доклада соискателя и одобрен на заседании научного семинара кафедры биотехнологии учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет» (протокол № 3 от 12.06.2025 г.).

На научном семинаре присутствовало 14 сотрудников, из них: докторов наук – 2, кандидатов наук – 8:

Болтовский В.С. (профессор кафедры ХПД и кафедры биотехнологии БГТУ,

д.т.н., сп. 05.21.03);

Безбородов В.С. (профессор кафедры органической химии, д.х.н., сп. 02.00.03);

Игнатовец О.С. (доцент кафедры биотехнологии БГТУ, к.б.н., сп. 03.00.16);

Леонтьев В.Н. (зав. кафедрой биотехнологии БГТУ, к.х.н., спец. 02.00.10);

Маркевич Р.М. (доцент кафедры биотехнологии БГТУ, к.х.н., сп. 05.21.04);

Флюрик Е.А. (заведующая кафедрой ТНВ и ОХТ, к.б.н., сп. 03.00.16);

Рымовская М.В. (доцент кафедры биотехнологии БГТУ, к.т.н., сп. 05.23.04);

Феськова Е.В. (доцент кафедры биотехнологии БГТУ, к.т.н., сп. 05.18.07);

Остроух О.В. (доцент кафедры биотехнологии БГТУ, к.т.н., сп. 05.21.03);

Чернецкая Ю.Г. (доцент кафедры биотехнологии, к.ф.н., сп. 14.04.02).

В открытом голосовании приняло участие 10 человек.

Результаты голосования: «за» – 10, «против» – нет, «воздержались» – нет.

Отзыв принят открытым голосованием единогласно.

Председатель научного семинара,
заведующий кафедрой биотехнологии
УО «Белорусский государственный
технологический университет»,
кандидат химических наук, доцент

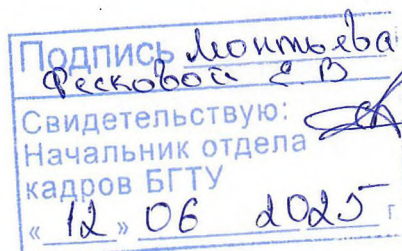
В.Н. Леонтьев

Эксперт,
доцент кафедры биотехнологии
УО «Белорусский государственный
технологический университет»,
кандидат биологических наук, доцент

О.С. Игнатовец

Секретарь научного семинара,
доцент кафедры биотехнологии
УО «Белорусский государственный
технологический университет»,
кандидат технических наук, доцент

Е.В. Феськова



В.Н., Игнатовец О.С.

отзыв поступил
16.06.2025

Секретарь ТР

Сопроводитель с отзывом ознакомлен
заместитель В.Н. Леонтьев М.А.
Ученый секретарь совета по
ТР

Личную подпись
удостоверяю



Ученый секретарь

16.06.2025