

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 14.05.2021 г. № 7

о присуждении Пошихонцевой Веронике Юрьевне, гражданке РФ, ученой
степени кандидата биологических наук

Диссертация «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 03.03.2021 г., протокол № 2 диссертационным советом Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., г. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Пошихонцева Вероника Юрьевна, 1991 г. рождения, в 2013 г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского» по специальности «Биоинженерия и биоинформатика», в 2015 г. окончила с отличием магистратуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки высшего профессионального образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт» по направлению подготовки 020200 «Биология». С 2015 по 2019 гг.

В.Ю. Пошихонцева работает младшим научным сотрудником лаборатории микробиологической трансформации органических соединений в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской

академии наук – обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Диссертация выполнена в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Научный руководитель: Донова Марина Викторовна, доктор биологических наук (специальность 03.02.03 – микробиология), главный научный сотрудник Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», лаборатория микробиологической трансформации органических соединений, заведующая лабораторией.

Официальные оппоненты:

Коршунова Татьяна Юрьевна, доктор биологических наук, специальность 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), лаборатория биотехнологий Уфимского Института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения Уфимского Федерального исследовательского центра Российской академии наук, ведущий научный сотрудник,

Потехина Наталья Викторовна, доктор биологических наук (специальность 03.02.03 – микробиология), лаборатория физиологии и биохимии микробов кафедры микробиологии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», ведущий научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» Министерства науки и высшего образования, г. Саранск, в своем положительном заключении, подписанном Ревиним Виктором Васильевичем, доктором биологических наук, профессором, деканом факультета биотехнологии, биоинженерии и биохимии, указала, что диссертационная работа Пошихонцевой Вероники Юрьевны «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) является самостоятельным, завершенным научным исследованием, выполненным на высоком научном уровне. В ходе работы получен активный штамм-продуцент такролимуса, на его основе разработан прототип технологии полного цикла для производства высококачественной фармацевтической субстанции такролимуса. По своей актуальности, научной новизне и теоретико-практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а Пошихонцева Вероника Юрьевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет **18** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации - **18** работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях - **7** работ, тезисов в материалах научных конференций - **10**, и **1** патент РФ. Общий объем работ – **4,1 п. л.**

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Пошихонцева, В.Ю.** Влияние состава крахмала на биосинтез иммунодепрессанта такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces*

- tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, Г.В. Суходольская, А.А. Шутов, М.В. Донова // **Прикл. Биохим. Микробиол.** – **2019.** – Т. 55, № 5. – С. 481-491. РИНЦ, IF = 1,022. Цит. 1.
2. **Poshekhontseva**, V.Y. Draft Genome Sequence of FK506-Producing *Streptomyces tsukubensis* Strain VKM Ac-2618D / **V.Yu. Poshekhontseva**, E.Y. Bragin, V.V. Fokina, V.Y. Shtratnikova, I.P. Starodumova, S.V. Tarlachkov, M.V. Donova // **Microbiol. Res. Announc.** – **2019.** – V. 8, № 24. – e00510-19. SCOPUS, WoS, **Q4**, IF = 1,7.
 3. **Пошехонцева, В.Ю.** Влияние низших грибов на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, Г.В. Суходольская, А.А. Шутов, М.В. Донова // **Биотехнология.** – **2019.** – Т. 35, № 5. – С. 42-50. РИНЦ, SCOPUS, **Q4**, IF = 0,56. Цит. 1.
 4. Салионов, Д.С. Разработка способа выделения и очистки такролимуса, синтезированного актинобактериями *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д / Д.С. Салионов, **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, А.А. Шутов, В.М. Николаева, Г.Г. Васяров, Е.В. Титова, В.С. Карасев, С.М. Староверов, М.В. Донова // **Прикл. Биохим. Микробиол.** – **2020.** – Т. 56, № 6. – С. 602-611. РИНЦ, IF = 1,022.
 5. **Пошехонцева, В.Ю.** *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д – эффективный продуцент такролимуса / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, С.В. Тарлачков, А.В. Мачулин, А.А. Шутов, М.В. Донова // **Биотехнология.** – **2021.** – Т. 37, № 1. – С. 26-36. РИНЦ, SCOPUS, **Q4**, IF = 0,56.
 6. **Пошехонцева, В.Ю.** Таксономия такролимус (FK506)-синтезирующего штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и влияние компонентов среды на активность продуцента / **В.Ю. Пошехонцева**, Г.В. Суходольская, С.А. Гулевская, В.В. Фокина, М.В. Донова // **Росс. Иммунол. Журн.** – **2015.** – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 746-748, РИНЦ, IF = 0,67.
 7. **Пошехонцева, В.Ю.** Естественная изменчивость *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д и селекция высокоактивного продуцента такролимуса (FK506) / **В.Ю. Пошехонцева**, Г.В. Суходольская, В.В. Фокина, С.А. Гулевская, М.В. Донова // **Росс. Иммунол. Журн.** – **2015.** – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 749-750, РИНЦ, IF = 0,67.
 8. **Пат. 2722699** Российская Федерация, МПК С12N 1/20, С12Р 17/18, С12R 1/465. Штамм актиномицета *Streptomyces tsukubensis* – продуцент такролимуса и способ получения такролимуса / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В.

Фокина, А.А. Шутов, М.В. Донов. № 2019112813; заявл. 24.04.2019; опубл. 03.06.2020, Бюл. № 16.

На диссертацию и автореферат поступило 7 положительных отзывов от: (1) канд. химич. наук. **Кузнецова Михаила Александровича**, старшего научного сотрудника лаборатории новых химических технологий для медицины кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва – без замечаний; **(2)** канд. биол. наук **Егоровой Ольги Валерьевны**, старшего научного сотрудника Федерального научного центра гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана Роспотребнадзора, г. Мытищи – с замечаниями: «Поскольку коммерческие наборы тестов API ZYM, использованные диссертантом в работе для выявления биохимических свойств, основаны на метаболической активности микроорганизмов, которая влечет изменение цвета лунок стрипов, то использование таких формулировок как «высокая эстеразная, лейцин-ариламидазная активность» представляется не совсем оправданным, поскольку данные тест-системы являются прежде всего качественными и не позволяют судить об уровне активности ферментов; При отображении основных параметров биосинтеза такролимуса в ферментерах на рис. 16 целесообразно было бы на первой оси ординат указать содержание такролимуса в культуральной среде вместо перемешивания или в подписях к рис. 16 указать конкретный номер ферментации. В представленном варианте оформления рисунка сложно соотнести фактическую концентрацию FK-506, достигнутую в ходе масштабирования технологии; Так как в Заключение автор указывает, что при изучении диссоциации штамма... выявлены критерии селекции его наиболее активных диссоциантов..., то в тексте автореферата следовало бы четко описать критерии селекции, что, вероятно, и было сформулировано в тексте самой диссертации». **(3)** канд. биол. наук. **Валидова Шамяля Завдатовича**, старшего научного сотрудника Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, г. Казань – с замечаниями: «Несмотря на то, что в научной литературе встречаются оба варианта написания видового эпитета, и, как указано в тексте диссертации, «*tsukubensis*» является уточненным названием, автору следует использовать для

своих штаммов один из этих двух вариантов: *tsukubaensis* или *tsukubensis*; в разделе 4.5.3.3 «Влияние состава крахмала» при обсуждении результатов хотелось бы видеть больше сравнения с данными, полученными другими исследователями, а там, где такие исследования отсутствуют – указания, что такие результаты получены впервые; Влияние разветвленных высокомолекулярных крахмалов и целых клеток грибов или их компонентов на синтез такролимуса является интересным фактом. Имеются ли в мировой научной литературе работы, которые описывают, например, влияние грибных клеток на синтез вторичных метаболитов у стрептомицетов? Насколько стабильны диссоцианты штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д? Возможны ли дальнейшие превращения диссоцианта Д2 в сторону диссоциантов с ещё большей продукцией такролимуса?» (4) д-ра биол. наук **Рукавцовой Елены Борисовны**, старшего научного сотрудника лаборатории биотехнологии растений Филиала института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Пущино – без замечаний; (5) канд. биол. наук **Тюминой Елены Александровны**, младшего научного сотрудника лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь – без замечаний; (6) д-ра биол. наук **Плотниковой Елены Генриховны**, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь – без замечаний; (7) д-ра биол. наук **Батлуцкой Ирины Витальевны**, заведующей кафедры биотехнологии и микробиологии Института фармации, химии и биологии Белгородского национального исследовательского университета, г. Белгород – с замечаниями: «В разделе Выделение и очистка такролимуса допущена неточность - взвесь мицелия

удаляли вакуумным насосом. Наверно, правильнее сказать = с использованием насоса».

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что д-р биол. наук **Коршунова Татьяна Юрьевна** является признанным специалистом в сфере биотехнологии и микробиологии бактерий – продуцентов антифунгальных агентов, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Пошихонцевой В.Ю. (**Микробиол.** – 2016. – Т. 85. – № 3. – С. 317–326; **Прикл. Биохим. Микробиол.** – 2017. – Т. 53. – № 2. – С. 204–212; 2019. - Vol. 55, N 4. - С. 338–349; **Изв. РАН. Сер. Биол.** – 2017. – № 5. – С. 507–515; **Ест. Тех. Науки.** – 2019. – № 7 (133). – С. 37–40; **Front. Plant Sci.** - 2019. - Vol. 10, N JAN. - P. 1368; **Вестн. Мос. Универ. Сер. 16. Биол.** – 2020. – Т. 75. – № 4. – С. 244–250; **Plants** - 2020. - Vol. 9, N 3. - P. 379);

д-р биол. наук **Потехина Наталья Викторовна** является специалистом в области таксономии микроорганизмов и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Пошихонцевой В.Ю. (**Ach. Life Sci.** – 2016. – V. 10. – P. 4; 2016. – V. 10. – P. 52; **Биохимия.** – 2018. - Т. 83. № 6. - С. 915-925; 2020. – Т. 85. – №. 3. – С. 428–437; 2020. – Т. 85. – №. 5. – С. 736–742; **Carbohydr. Res.** – 2017. - V. 449. - P. 134–142; 2019. - V. 482. - P. 1-7; 2021. – V. 499. – P. 108233; P. 108247; **Микробиол.** - 2021. - Т. 89. № 1. - С. 122-128).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области микробных технологий, в т.ч. технологий производства микробных полисахаридов и биокомпозиционных материалов с биологическими связующими на основе полисахаридов и биомассы микроорганизмов, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Пошихонцевой В.Ю. (**BioResources.** – 2016. – V. 11. – №. 4. – P. 9661–9675; 2019. - Т. 13, N 3. - С. 5554-5568; **J. Biotechnol.** – 2016. – V. 231. – P. 12; **Electron. J. Biotechnol.** – 2018. – V. 31. – P. 61–66; **Braz. Arch. Biol. Tech.** – 2018. – V. 61. – P. e18160406; **AMB Express.** - 2020. - Т. 10, N 1. - С. 84; **Микробиол.** – 2020. – Т. 89. – №. 1. – С. 88–98; **Прикл. Биохим. Микробиол.** - 2021. - Т.57, N 1. - С. 1-9), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Пошихонцевой В.Ю.

Диссертационный совет отмечает, что, на основании выполненных соискателем исследований:

разработана и масштабирована биотехнология полного цикла производства такролимуса с получением кристаллического продукта фармакопейного качества;

предложены два новых штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и Т60, продуцирующих такролимус; расшифрован полный геном штамма *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, выявлен кластер из 26 генов биосинтеза такролимуса;

доказано, что наиболее активный штамм-продуцент такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д характеризуется диссоциацией и фенотипической изменчивостью; выявлен диссоциант, обеспечивающий максимальный уровень продукции такролимуса;

введены критерии стимуляции биосинтеза такролимуса у стрептомицетов клетками низших эукариотов (дрожжей и мицелиальных грибов); впервые изучено влияние низко- и высокомолекулярных крахмалов различной структуры на биосинтез такролимуса; выявлена нежелательная деструкция такролимуса культурой продуцента и разработан способ ее устранения за счет применения полимерных сорбентов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана несостоятельность гипотезы о влиянии эргостерина как маркерного компонента мембран низших эукариотов на запуск каскада реакций синтеза такролимуса; предложена гипотеза, что различное влияние биомассы грибов на биосинтез такролимуса культурой стрептомицета обусловлено различиями в составе их клеточных стенок;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (культивирование бактерий, оптимизация процессов биосинтеза в лабораторных условиях в колбах и в биореакторах), биохимических (определение способности штаммов использовать различные субстраты в качестве единственного источника углерода и энергии; определение активности ферментов, выделение клеточных стенок бактерий; определение состава жирных кислот клеточных стенок и аминокислотного состава пептидогликанов; выделение, очистка и определение состава

менахинонов), биотехнологических (выбор оптимальных условий биосинтеза такролимуса), молекулярно-генетических (выделение ДНК, определение содержания Г+Ц-пар в ДНК, секвенирование, ДНК-ДНК гибридизация), биоинформатических (филогенетический анализ, компьютерная обработка ридов, аннотация генома, dDDH), также ряда других методов: световой микроскопии, сканирующей электронной микроскопии;

изложены данные, полученные при расшифровке полного генома штамма-продуцента *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, в том числе - обнаружение кластера генов биосинтеза такролимуса, что важно для дальнейших исследований молекулярных механизмов биосинтеза этого продукта и инженерии новых штаммов-продуцентов такролимуса;

раскрыт новый эффект стимуляции биосинтеза такролимуса клетками низших эукариотов и его зависимость от полисахаридного состава их клеточных стенок.

изучена впервые выявленная связь между структурой высоко- и низкомолекулярных крахмалов в питательных средах и их влиянием на эффективность биосинтеза такролимуса; установлено преимущество использования высокомолекулярных крахмалов с разветвленной структурой;

проведена модернизация методов биосинтеза полициклических макролидов клетками низших эукариотов, основанная на применении полимерных сорбентов, обеспечившая устранение деструкции образующихся молекул поликетидов культурой-продуцентом.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработана и масштабирована биотехнология полного цикла получения такролимуса, включающая этапы микробиологического синтеза, выделения и очистки с получением субстанции фармакопейного качества. Разработанная биотехнология может быть рекомендована в качестве основы для промышленного получения такролимуса (Акт испытаний ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» от 24.09.2020 г.) - **учрежденческий уровень внедрения;**

определены методические подходы, которые могут быть применены в биосинтетических процессах производств других востребованных поликетидов: в частности, применение полимерных смол оптимизированного в работе состава может быть использовано для устранения нежелательной деструкции макролидов и сокращения этапов очистки целевого продукта;

создан уникальный способ очистки такролимуса от близких структурных аналогов, который может быть использован при получении других поликетидов сходной структуры; полученные данные о влиянии структуры крахмалов на биосинтез такролимуса стрептомицетами важны для культивирования штаммов-продуцентов на крахмалсодержащих средах;

представлены результаты геномного исследования штамма-продуцента такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, важные для получения новых микробных продуцентов с улучшенными биосинтетическими возможностями; последовательность генома данного штамма размещена в международной базе данных NCBI, код доступа NZ_SGFG00000000.1 - **международный уровень внедрения.**

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

идея диссертационного исследования о разработке биотехнологии получения такролимуса бактериями рода *Streptomyces* опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по изучению и применению стрептомицетов для получения ценных макроциклических поликетидов;

установлена частичная корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной и патентной литературе данными независимых зарубежных авторов, в части – получения такролимуса микробиологическим способом;

использованы современные методы получения и обработки информации, анализа и визуализации данных, в том числе цифровые системы документирования изображений и современное программное обеспечение.

Личный вклад соискателя состоит в личном участии автора в экспериментальной работе на всех этапах исследований, в анализе научной и патентной литературы, планировании и проведении экспериментов, разработке и апробации биотехнологии получения такролимуса, обработке, оформлении и публикации результатов.

На заседании 14.05.2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Пошихонцевой В.Ю. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **15** человек, из них **7** докторов наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), участвовавших в заседании, из **22** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **15**, против **нет**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель
диссертационного совета
д.б.н., профессор _____ (Шемякин Игорь Георгиевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н. _____ (Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 14.05.2021 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.