

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА

Д 999.095.03, созданного на базе Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Тверского государственного университета Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета
от 25 мая 2021 года, протокол № 9

О присуждении Калёнову Сергею Владимировичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора технических наук.

Диссертация «Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред» в виде рукописи по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), технические науки, принята к защите «20» февраля 2021 года, протокол № 3, диссертационным советом Д 999.095.03, созданным на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук (125047, Москва, Миусская площадь, 9, приказ о создании диссертационного совета от «28» сентября 2016 года №1172нк).

Соискатель Калёнов Сергей Владимирович «9» мая 1977 года рождения, гражданин Российской Федерации, в 2001 году окончил Государственное образовательное учреждение «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Министерства образования Российской Федерации. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата технических наук на тему «Культивирование дрожжей и галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса» защитил в 2007 году в диссертационном совете ДМ.212.204.13, созданном на базе Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Федерального агентства по образованию.

Работает в должности доцента кафедры биотехнологии Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация выполнена на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный консультант: Складнев Дмитрий Анатольевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биофизики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского», Саратов;

Борисенко Евгений Георгиевич, доктор технических наук, профессор кафедры биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва;

Похиленко Виктор Данилович, доктор технических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск,

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, в своем *положительном* заключении, подписанном доктором биологических наук, профессором, проректором по научной и инновационной деятельности, заведующим кафедрой биохимии и биотехнологии Корнеевой Ольгой Сергеевной, указала, что диссертационная работа Калёнова Сергея Владимировича представляет собой полное и завершённое исследование, обладающее высокой научной и практической значимостью. Диссертация содержит результаты, полученные на основании исследований, проведенных на высоком научно-методическом уровне с применением современных методов исследования, и вносит значительный вклад в развитие биотехнологии экстремально галофильных микроорганизмов, а ее научные положения и результаты могут рассматриваться как научное достижение. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором, теоретически обоснованы и не вызывают сомнений. Диссертационное исследование Калёнова Сергея Владимировича соответствует паспорту специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020), а ее автор Калёнов Сергей Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры биохимии и биотехнологии «29» апреля 2021 года, протокол № 8).

Соискатель имеет 117 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 42 работы, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 19 работ. Общий объем публикаций составляет 228 страниц. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах. Работы опубликованы с соавторами, личный вклад соискателя составляет 80-90% и состоит в разработке научной концепции исследований, постановке задач, выполнении экспериментальных исследований и интерпретации полученных результатов. Соискателем опубликовано 19 работ в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов. Соискателем получено 3 патента, 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ, издано 2 учебных пособия. Депонированных рукописей не имеет.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. **Kalenov S. V.**, Baurina M. M., Skladnev D. A., Kuznetsov A. Y. High-effective cultivation of halobacterium salinarum providing with bacteriorhodopsin production under controlled stress // Journal of Biotechnology. 2016. V. 233. P. 211–218. (Scopus, Web of Science)
2. **Kalenov S. V.**, Gordienko M. G., Murzina E. D., et al. Halobacterium salinarum storage and rehydration after spray drying and optimization of the processes for preservation of carotenoids // Extremophiles. 2018. V. 22. № 3. P. 511–523. (Scopus, Web of Science)
3. **Калёнов С. В.**, Градова Н. Б., Сивков С. П., Агалакова Е. В., Белов А. А., Суясов Н. А., Хохлачев Н. С., Панфилов В. И. Препарат на основе бактерий, выделенных из гиперсоленых сред,

На автореферат диссертации поступило 9 отзывов, все *положительные*. В отзывах указывается, что представляемая работа характеризуется высоким теоретическим и экспериментальным уровнем, имеет большое научное и практическое значение и по своей новизне и актуальности соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии.

Отзывы поступили от **Алексеева Алексея Леонидовича**, доктора биологических наук, профессора кафедры пищевых технологий и товароведения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Донской государственный аграрный университет»; **Цугкиева Бориса Георгиевича**, доктора сельскохозяйственных наук, директора Научно-исследовательского института биотехнологии, заведующего кафедрой биологической и химической технологий и **Гагиевой Ларисы Черменовны**, доктора биологических наук, доцента той же кафедры Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Горский государственный аграрный университет»; **Салиной Елены Геннадьевны**, доктора биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; **Ходонова Андрея Александровича**, доктора химических наук, ведущего научного сотрудника Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук; **Сербы Елены Михайловны**, доктора биологических наук, члена-корреспондента Российской академии наук, доцента, заместителя директора по научной работе Всероссийского научно-исследовательского института пищевой биотехнологии – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи; **Дворецкого Дмитрия Станиславовича**, доктора технических наук, профессора, заведующего кафедрой технологии и оборудования пищевых и химических производств Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тамбовский государственный технический университет»; **Храмцова Андрея Георгиевича**, академика Российской академии наук, доктора технических наук, профессора, профессора-консультанта кафедры прикладной биотехнологии и **Лодыгина Алексея Дмитриевича**, доктора технических наук, доцента, заведующего кафедрой прикладной биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет»; **Колотиловой Натальи Николаевны**, доктора биологических наук, доцента кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; **Кедика Станислава Анатольевича**, доктора технических наук, профессора, заведующего кафедрой биотехнологии и промышленной фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет».

В отзывах содержатся следующие **замечания**:

1. В таблице 4 при получении зерновых ферментализатов указаны дозировки ферментов в процентном соотношении, считаю, что данный подход для научных исследований не совсем корректен. ФП различаются по уровню в них ферментативной активности, и при разработке технологии могут возникнуть проблемы при установлении норм их расхода. В исследовательской практике при работе с ФП дозирование осуществляют из расчета количества единиц активности, определенной по ГОСТу или стандартизированным методикам, на единицу субстрата и тогда нормы расхода не зависят от уровня активности в препарате.

2. Для удешевления компонентов питательной среды и использования биомассы галоархей в качестве пищевых и кормовых добавок в работе рассмотрена возможность использования ферментализатов растительного сырья, однако в автореферате не представлены сравнительные

исследования с «дорогостоящими» (триптон, пептон, дрожжевой экстракт) питательными средами.

3. Почему некоторые аминокислоты – компоненты оптимизированных синтетических питательных сред (табл. 2 на стр. 14), вносились в L-форме, а некоторые в виде смеси D- и L-форм?

4. Чем вызвана необходимость внесения рибонуклеиновой кислоты в состав оптимизированных синтетических питательных сред (табл. 2 на стр. 14)?

5. Какой компонент оптимизированных питательных сред (табл. 2 на стр. 14) является источником ионов микроэлементов Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , являющимися кофакторами некоторых специфических ферментных систем галоархей, необходимых для культивирования?

6. В таблице 4 (с. 22) не указаны доверительные интервалы значений выходных параметров – концентрации каротиноидов и протеазной активности по казеину.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в данной области биотехнологии, что подтверждается наличием соответствующих публикаций в ведущих научных рецензируемых журналах и изданиях.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- показано влияние и возможное действие продуктов химического/фотохимического окисления компонентов питательной среды и метаболитов на биосинтетическую активность разных штаммов–продуцентов бактериородопсина и каротиноидов;

- изучены биотехнологические аспекты, обеспечивающие высокоплотностное культивирование галоархей, прежде всего – антиоксидантные свойства, химическая/фотохимическая трансформация компонентов питательной среды и метаболитов клеток *Hbt. salinarum*, а также режимы освещения растущих культур. Доказано, что перечисленные параметры находятся в тесной взаимосвязи и определяют итоговую биосинтетическую активность штаммов-продуцентов значимых целевых биологически активных соединений;

- впервые для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* использованы ферментоллизаты зерновых как источники аминокислотного питания и ростовых факторов;

- оптимизирован процесс распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum*, исследовано длительное хранение высушенной биомассы, изучен характер сопутствующих повреждений клеток экстремально галофильных архей;

- доказано, что при нестерильном культивировании экстремально галофильных архей и высокогалотолерантных бактерий возможна контаминация и быстрое замещение исходных культур микроорганизмов-продуцентов. Впервые показана возможность развития негалотолерантных бактерий рода *Bacillus* совместно с экстремально галофильными археями или высокогалотолерантными бактериями в условиях экстремально высокой солености среды. Показана возможность индукции галовирусов непосредственно в ходе культивирования экстремально галофильных архей;

- из микробных сообществ гиперсоленых сред выделены в чистом виде бактериальные культуры, обладающие высокой уреазной активностью и способностью к биокальцинированию.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- проведен комплексный анализ сообществ экстремальных галофилов, отдельных микроорганизмов во взаимосвязи с физико-химическими особенностями среды их обитания;

- определены пределы устойчивости отдельных микроорганизмов и сообществ экстремальных галофилов; выявлены стратегии адаптации галофилов в составе сообществ при изменении параметров окружающей среды и состава микробного сообщества (в том числе в критических физико-химических условиях, приводящих к кардинальному изменению состава сообщества);

– подтверждены особенности метаболизма экстремальных галофилов при изменении физико-химических параметров среды обитания: проанализированы механизмы защиты микроорганизмов при высушивании/регидратации, повышении/понижении температуры, при различных значениях pH, облучении (различной мощности и спектра) т.д.;

– предложены и обобщены механизмы регуляции клеточного и фотозависимого энергетического метаболизма галофилов и установлено их влияние на выработку практически значимых биологически активных соединений.

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

– разработаны оптимальные составы питательных сред для культивирования производственных штаммов галоархей *Halobacterium salinarum*;

– оптимизированы режимы культивирования и разработано высокоплотностное культивирование производственных штаммов галоархей;

– создан высокоавтоматизированный комплекс и разработано адаптивное программное обеспечение для культивирования галоархей;

– оптимизировано высушивание биомассы галоархей и изучены процессы, происходящие с их биомассой при длительном хранении;

– проведена технико-экономическая оценка различных вариантов производства биомассы *Halobacterium salinarum* и бактериородопсина, разработана высокоэффективная технологическая схема промышленного производства;

– получены высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum* для биотехнологического применения: новые штаммы-продуценты фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина, отличающиеся сниженным уровнем спонтанных мутаций; штамм-продуцент C₅₀-каротиноидов, обладающий повышенной устойчивостью к поражению вирусами.

– создан биопрепарат, основанный на принципе биогенного карбонатолиза в присутствии микроорганизмов из сообществ гиперсоленых сред, для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона.

Результаты работы имеют большой практический потенциал, что подтверждается актами внедрения, регламентирующей документацией и патентами. Результаты работы могут быть рекомендованы для изучения и внедрения в научных и образовательных организациях, на предприятиях биотехнологической промышленности и использованы организациями, занимающимися разработками биомолекулярных устройств, продуктов функционального питания, биопрепаратов для медицины, сельского хозяйства, строительной отрасли.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

– исследования, представленные автором диссертации, проведены на высоком научном, технологическом и методическом уровне с привлечением современных физико-химических, биохимических молекулярно-биологических и статистических методов;

– особо можно отметить разработанные автором оригинальные методики и аппаратное оформление систем регулирования, комплексный подход к компоновке оборудования, высокоавтоматизированный комплекс и программное обеспечение позволили очень точно регистрировать изменения в метаболизме и регулировать процессы культивирования;

– основные концепции, изложенные в работе подтверждаются высокой воспроизводимостью результатов, детальным анализом современных литературных источников, посвященных экстремально галофильным микроорганизмам, а также подробным объяснением полученных результатов на их основе.

Личный вклад соискателя состоит в постановке целей и задач диссертационного исследования, анализе современных литературных источников, конструировании лабораторных и

