

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук, заведующего кафедрой биохимии и биофизики Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского

Конновой Светланы Анатольевны

на диссертационную работу Мурзиной Екатерины Дмитриевы «Основы технологии получения биомассы *Halobacterium salinarum* на ферментативных гидролизатах зерновых», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы выполненной работы

Интерес ученых к исследованию представителей экстремальных галофильных архей связан с широким кругом метаболитов, которые эти микроорганизмы производят.

Археи весьма перспективны для получения продуктов, которые находят применение в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве. Однако возможности архей в настоящее время в биотехнологическом плане изучены и использованы недостаточно. Наиболее исследованной является культура галоархей *Halobacterium salinarum*, которая как и другие представители архей обладает различными физиологическими адаптационными возможностями, обеспечивающими осмотолерантность. Среди метаболитов, которые производят *Halobacterium salinarum* – витамины, микроэлементы, галоцины, уникальные, устойчивые к денатурирующим воздействиям ферменты, фосфолипиды, С50– каротиноиды, бактериородопсин. Для получения этих биологически активных веществ необходимы технологии наращивания биомассы однородной, с высоким выходом целевого продукта, на субстратах отечественного производства.

Одной из наиболее важных проблем наращивания биомассы *Halobacterium salinarum* в технологических целях является требовательность этих микроорганизмов к источникам углерода пептидной и белковой природы, которыми в селективных для этих микроорганизмов средах являются пептон, триптон, а источником витаминов – дрожжевой экстракт. Эти субстраты для выращивания архей являются импортными и

дорогостоящими. Поэтому тема исследования диссертанта актуальна и представляет научно-практический интерес.

Новизна исследований и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Ключевой проблемой, которой занималась в ходе выполнения диссертационной работы Е.Д. Мурзина, является оптимизация среды выращивания для перспективного продуцента ряда биологически активных компонентов *H. salinarum*, с использованием ферментоллизатов зерновых, а также способа высушивания полученной биомассы галоархей. Ряд результатов диссертационной работы Мурзиной Е.Д., являются приоритетными:

из ферментоллизатов зерновых получены питательные среды, которые по своим характеристикам превосходят стандартные среды для культивирования галобактерий; культивирование *H. salinarum* на ферментализатах пшеничной и ячневой круп выполнено впервые, при этом на оптимизированной среде культура проявляет повышенные протеолитическую активность, накопление биомассы и каротиноидов; разработаны оптимальные для сохранности каротиноидов режимы распылительной сушки биомассы *H. salinarum*;

выявлены факторы, влияющие на показатели реактивации при длительном хранении после высушивания.

Обоснованность выводов автора и достоверность полученных результатов подтверждается тщательной методической проработкой экспериментальных данных, статистической обработкой результатов исследования, использованием методов молекулярной биотехнологии, классических и современных микробиологических и физико-химических методов, в том числе электронной микроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Значимость для науки и производства, полученных автором диссертации результатов

Значимость для науки и практики полученных Мурзиной Е.Д. результатов заключается в разработке и апробации в промышленных условиях технологии наращивания высокоплотной культуры представителя галоархей *H. salinarum* на ферментализатах крупы злаковых культур – пшеницы и ячменя.

Установлен режим работы распылительной сушки для длительного сохранения клеток с наименьшими потерями биологически активных веществ, выявлены диапазоны параметров для сохранения биомассы галобактерий в солевых гранулах.

Получен и приложен к диссертации акт внедрения результатов в производственный процесс.

Получен патент № РФ 2662996 на штамм *H. salinarum* 353П-1 (номер ВКПМ В-12794), с повышенной продуктивностью по выходу биомассы клеток, каротиноидов, жирных кислот, и при этом обладающий повышенной устойчивостью к вирусному поражению.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Материалы диссертации, разработанная технология может стать основой для производства и длительного хранения биомассы галоархей, важных для получения биологически активных веществ, таких как каротиноиды, жирные кислоты и др.

Для производства несомненно востребована технология получения на основе термообработки и ферментализации растительного сырья из злаков питательной среды для микроорганизмов, не уступающей по ключевым параметрам классическим средам с пептоном, триптоном и дрожжевым экстрактом. Использование доступного, недорогого отечественного сырья решает проблему замещения импортного сырья.

Новые данные о технологии сушки клеток галобактерий в критическом и повреждающем режимах при высоких скоростях испарения воды и кристаллизации соли, высоких температурах, механических и окислительных нагрузках могут быть использованы в биофармацевтических производствах.

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации.

Диссертация Е.Д. Мурзиной изложена на 145 страницах текста, иллюстрирована 24 рисунками, 16 таблицами.

Диссертация состоит из введения, аналитического обзора литературы, экспериментальной части, выводов, библиографического списка, включающего 264 источника, в том числе 211 зарубежных авторов, приложений.

Результаты диссертации достаточно полно опубликованы и представлены в 9 статьях, в том числе 3-х в журналах, рекомендуемых ВАК, 5-ти тезисах докладов. Финансово работа поддержана грантом: “Разработка технологии получения импортозамещающих пищевых ингредиентов и белковых кормовых продуктов, обогащенных

функциональными компонентами, на основе возобновляемого растительного сырья” (Номер проекта: 16-19-10469).

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, сформулирована цель и 6 задач, направленных на ее реализацию. Приведены аргументы, демонстрирующие научную новизну и практическую значимость результатов, представленных в диссертационной работе.

Глава 1 – Обзор литературы занимает 46 страниц диссертационной работы, построен логично, включает разделы с общей характеристикой экстремальных галофильных микроорганизмов, отдельно суммирует сведения об особенностях физиологии представителей архей. Один из подразделов обзора посвящён характеристике различных метаболитов, продуцируемых археями, в том числе каротиноидов галоархей, галородопсина, различных ферментов (экстремозимов), главным образом из класса гидролаз, экзополисахаридов. Также представлены сведения о других метаболитах с акцентом на возможное их использование в медицине, фармацевтике и других отраслях. Заключительный раздел обзора посвящён анализу литературы по использованию биомассы архей и составе сред для их выращивания, а также известных разработках технологий длительного хранения биомассы.

В качестве критики обзора необходимо указать на недостаточную представленность в списке цитирования публикаций последних пяти лет, кроме того считаю излишними ссылки на собственные публикации, вынесенные в автореферат, как основные по защищаемой диссертационной работе.

Глава 2 посвящена описанию методов исследования, выбор которых адекватен поставленным цели и задачам. Методы и подходы представлены подробно, приведены основные характеристики штаммов, используемых в работе, сравнительные характеристики активности ферментов, схема биореактора и ряд аналитических методов. Подробно описаны процедуры пробоподготовки, ферментолиза и прочие методы биотехнологии.

В главе 3 представлены результаты исследований на 27 страницах, глава поделена на 5 подпунктов. Знакомство с содержанием главы позволяет отметить большой объем работы, выполненной диссертантом, в ходе которой поэтапно решаются задачи, связанные с подбором ферментных препаратов и режимов обработки зернового сырья, оптимизацией концентрации компонентов питательной среды для увеличения выхода биомассы галобактерий и каротиноидов. На втором этапе автор выполнил

высокоплотностное культивирование отобранных штаммов в мембранном биореакторе на полученных гидролизатах зерна. И наконец, были оптимизированы режимы высушивания биомассы галобактерий с сохранением биологической активности компонентов клеток, в том числе и при длительном хранении. Таким образом диссертационное исследование носит законченный характер, охватывает полный цикл операций по наращиванию биомассы архей и получению биологически активных продуктов. Ряд полученных результатов носит приоритетный характер.

При прочтении главы возникли некоторые вопросы и замечания:

В тексте раздела 3.1.1 нет пояснения для какой цели при сравнительном исследовании протеолитической активности протосубтилина Гзх и Protex40E (табл. 6) по отношению к казеину взяты в качестве субстратов еще и крахмал и КМЦ Na, а также значения pH реакционной среды и температуры без учета известных оптимальных показателей для данных ферментов.

Хотелось бы знать мнение диссертанта относительно того, как можно унифицировать состав ферментолизата по содержанию и аминокислотному составу и прочим характеристикам, учитывая негетогенность исходного зернового материала.

Есть претензии к оформлению работы: в частности, в тексте встречаются неудачные выражения: стр. 30 «Ретинальпротеины галофильных биомолекул используются для различных применений...», стр. 31 «...галофильные ферменты...», «отфуговывали» стр.62, несогласование слов в предложениях на стр. 30-32, 35, 36, 38, 93 и пр. В таблицах присутствуют незаглавленные столбцы см. табл. 6, нет ссылки в тексте на табл. 10,

ссылки на литературные источники в тексте приводятся в одних случаях после точки, в других - до точки (стр. 14, 16, 23), есть нарушения ГОСТ при оформлении литературных источников в списке-цитируемой литературы.

Замечания не носят принципиального характера.

В работе изложены важные научно обоснованные результаты экспериментальных исследований, обеспечивающие решение актуальных научных и технологических задач, связанных с разработкой основ технологии получения биомассы *Halobacterium salinarum* на ферментолизатах зернового сырья, полученные результаты позволят реализовать производство галоархей в промышленном масштабе.

В целом, научная и практическая значимость работы, методический уровень и научная новизна позволяют сделать вывод о том, что диссертация Мурзиной

Екатерины Дмитриевы «Основы технологии получения биомассы *Halobacterium salinarum* на ферментативных гидролизатах зерновых», представленная на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. в ред. от 01.10. 2018 г.), а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

ФИО: Коннова Светлана Анатольевна

Ученая степень: доктор биологических наук

Специальность, по которой защищена докторская диссертация:

03.00.04 – биохимия (биологические науки) (2003 г.)

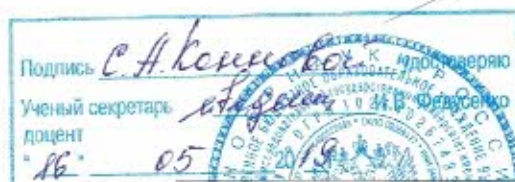
Ученое звание: профессор

Заведующий кафедрой биохимии и биофизики

ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского»



С.А. Коннова



Полное название организации: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского», биологический факультет

410012, ул. Астраханская, д. 83., г. Саратов

Контактный телефон: +7-917-218-32-21

e-mail: Konnovasa@yandex.ru