

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора ФГБУН ИМБИ

Я.О. Андрончик

« 28 » _____ 2019 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН» (ФГБУН ИМБИ) на диссертацию Мурзиной Екатерины Дмитриевны «Основы технологии получения биомассы *Halobacterium salinarum* на ферментативных гидролизатах зерновых», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы исследования

Гиперсоленые воды относятся к числу наиболее экстремальных местообитаний на планете. Несмотря на это, они населены уникальными организмами, имеющими огромный потенциал их использования в биотехнологии, благодаря синтезу ими уникальных веществ. Наиболее галофильными организмами являются археи – представители одного из трех доменов живых организмов. Путей их биотехнологического использования множество, включая широчайший спектр возможностей использования бактериородопсина, который используется для различных целей (фармакология, медицина, опреснение воды, создание фотохромных голографических сред, пространственных модуляторов оптического сигнала, биосенсоров, фотопленок, оптических компьютеров и т.д.). Галоархеи вида *Halobacterium salinarum* способны к интенсивному синтезу

бактериородопсина. Их массовое развитие в природе может вызывать специфическую окраску водоемов и фиалковый запах. Можно было бы собирать биомассу галоархей в природе, но это сопряжено с рядом трудностей. Поэтому уже в 1960-х годах начались эксперименты по их культивированию. Получение биомассы галобактерий является сложным многоступенчатым процессом, многие этапы которого все еще нельзя считать достаточно эффективными, устойчивыми и дешевыми. Нацеленность работы диссертанта на совершенствование основ технологии получения биомассы галобактерий *H. salinarum* делает ее несомненно актуальной с перспективой широкого внедрения. В частности, использование ферментолизатов зерновых культур в средах для выращивания позволит, вероятно, существенно удешевить процесс, а оптимизация режима высушивания и длительного хранения полученной биомассы может повысить эффективность производства.

Выполненное диссертантом исследование, таким образом, вносит вклад в решение проблем развития биотехнологического производства биомассы *H. salinarum*, которая может быть использована для получения не только бактериородопсина, но и других ценных продуктов (незаменимые витамины, микроэлементов, галоцинов, уникальных ферментов, фосфолипидов, С50 – каротиноидов и др.).

Научная новизна исследований

Автором впервые показана возможность культивирования галобактерий *H. salinarum* при использовании в качестве источника углерода ферментолизатов зерновых культур, т.е. возможность удешевления среды культивирования. Следует отметить, что получение крахмала и аминокислот из зерна путем его глубокой переработки дает возможность решить сразу два вопроса: импортозамещения компонентов культивационной среды и хранения излишков зерна низкого качества, так как для этого подходит зерно любого класса и качества. Применение новых сред и разработка оптимальных режимов культивирования позволили получить в мембранном

биореакторе культуру высокой плотности, что тоже является значимым достижением.

С использованием искусственных нейронных сетей были определены оптимальные для сохранности ценных компонент режимы распылительной сушки биомассы *H. salinarum* с целью получения высушенного продукта с заданными характеристиками.

Было показано отрицательное влияние метаболитов, вырабатываемых при росте популяции галобактерий, на показатели реактивации клеток при длительном их хранении после высушивания в солевых гранулах. Выяснено, что удаление метаболитов в процессе культивирования галобактерий, способствует более длительному сохранению жизнеспособности части клеток после распылительной сушки, т.к. они лучше сохраняют свою структуру при их внедрении в кристалл. Показано, что при таком хранении часть клеток реактивируется после 2-х лет хранения.

Личный вклад автора диссертации состоит в анализе имеющейся информации, постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, написании девяти статей (три из них в журналах из списка рекомендованных ВАК РФ). Личный вклад автора в исследование составляет 70–85 %.

Оценка содержания диссертации и автореферата

Структура и объем диссертации замечаний не вызывает. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и обсуждения, заключение, выводы, список литературы (264 источника, в том числе 216 публикаций на иностранных языках), приложения. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 12 таблицами.

Введение достаточно четко показывает актуальность проблематики диссертационной работы и формулирует цель и задачи, раскрывает научную новизну и практическую значимость исследования. Обзор литературы, написанный хорошим языком, достаточно полно освещает современное

состояние дел в исследуемой области. В методическом разделе достаточно подробно описаны все использованные в работе экспериментальные и статистические методы.

Основные результаты, полученные автором, состоят в следующем:

- Разработан метод культивирования *H. salinarum* с использованием ферментоллизатов зерновых на основе пшеничной и ячневой круп. При этом для обработки зернового сырья подобран режим тепловой предобработки острым паром и ферментный препарат Протосубтилин ГЗх.

- На основе ферментоллизатов пшеничной и ячневой круп с добавлением оптимальных количеств источников микроэлементов (соли Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) разработаны питательные среды для культивирования галобактерий, которые по своим характеристикам превосходят стандартные среды для культивирования галобактерий на комплексных субстратах.

- Подобраны оптимальные режимы культивирования галобактерий в мембранном биореакторе при использовании питательных сред на ферментоллизатах пшеницы и ячменя.

- С помощью искусственных нейронных сетей определены оптимальные для сохранности каротиноидов режимы распылительной сушки биомассы *H. salinarum* с удалением метаболитов, влияющих на выработку каротиноидов.

- Изучен процесс инкапсуляции клеток галобактерий в солевые гранулы при распылительной сушке и в процессе длительного хранения, установлен характер повреждений клеток при этом.

- Оценены факторы, влияющие на эффективность реактивации высушенных клеток, при этом показано отрицательное влияние метаболитов, вырабатываемых при культивировании галобактерий, на показатели реактивации при длительном хранении после высушивания. Удаление метаболитов, образовавшихся при культивировании галобактерий, при распылительной сушке способствует более длительному сохранению жизнеспособности клеток.

- Выделен непатогенный галобактериальный штамм *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794), полученный многоступенчатой селекцией исходного штамма *Halobacterium salinarum* 353 Пущинский без использования методов генетической модификации и обработки химическими или физическими мутагенными агентами. Штамм *Halobacterium salinarum* ВКПМ-12794 превосходит исходный по выходу биомассы, каротиноидов, важнейших ненасыщенных жирных кислот, обладает повышенной устойчивостью к вирусному поражению. На штамм получен патент.

Диссертация написана грамотно хорошим языком с использованием современной научной терминологии, результаты проиллюстрированы достаточным количеством рисунков и таблиц. Собственные результаты в сравнении с литературными данными обсуждены достаточно детально и всесторонне, сделанные выводы обоснованы в должной степени и убедительны. Выводы соответствуют поставленным цели и задачам. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Проведенное исследование в определенной степени расширяет знания по биологии и возможностям культивирования *H. salinarum*. Интересны данные по инкапсуляции клеток в соляные гранулы и реактивации клеток, т.к. позволит лучше понять приспособления архей к существованию в экстремальных пересыхающих водоемах. Выявленное отрицательное влияние метаболитов, вырабатываемых при росте галобактерий, позволяет лучше понять внутривидовые регуляторные механизмы архей.

Важными практическими результатами являются: 1. разработка и опытно-промышленное опробование способа и стадий получения конечного продукта – биомассы галобактерий *H. salinarum* на ферментолизатах зерновых, и 2. выведение высокопродуктивного штамма *H. salinarum*, продуцента С50-каротиноидов группы бактериоруберина, бактериородопсина и ненасыщенных жирных кислот.

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Исследования, результаты которых использованы для написания диссертации, проведены на высоком современном уровне с использованием адекватных поставленным задачам методов и устройств. Цель работы достигнута, поставленные задачи решены. Анализ данных проведен с использованием адекватных статистических методов. Достоверность полученных результатов и выводов не вызывает сомнений.

По результатам диссертационной работы опубликовано 9 статей, включая три в журналах, рекомендованных ВАК. Результаты были также представлены на 5 конференциях. Содержание опубликованных статей достаточно полно отражает содержание диссертации.

В целом диссертационная работа производит очень хорошее впечатление, не вызывая сомнений в том, что она вполне соответствует требованиям, которые предъявляются к кандидатским диссертациям.

В целом работа не вызывает возражений, но небольшие непринципиальные замечания сделать можно: 1. отсутствуют какие-либо приблизительные оценки себестоимости получения биомассы архей, что, вероятно, стоило бы сделать, т.к. говорится об удешевлении процесса культивирования, 2. не рассматриваются в сравнительном плане никакие другие технологии культивирования архей, например, совместно с одноклеточной зеленой водорослью *Dunaliella*, 3. из сделанного обзора неясно, используются ли для приготовления сред при культивировании архей другие источники органического вещества, кроме зерна? Например, весьма перспективным, на наш взгляд, выглядит использование очень дешевой биомассы зеленых нитчатых водорослей. Сделанные замечания ни в коей мере не затрагивают принципиальных положений диссертационной работы и не снижают высокую оценку рецензируемой диссертационной работы.

Диссертационная работа направлена на решение важной задачи – внедрение новых продуцентов важнейших биологически активных веществ в производство.

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту специальности научных работников 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» в части пунктов 2–4.

Диссертация соответствует п. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации 24.09.2013 № 842 (в редакции от 01.10.2018), а соискатель Мурзина Екатерина Дмитриевна достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв на диссертацию Е.Д. Мурзиной рассмотрен и утвержден на научном семинаре отдела физиологии животных и биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН» (ФГБУН ИМБИ) (протокол № 4 от 29 апреля 2019 г.)

Старший научный сотрудник
отдела физиологии животных
и биохимии ФГБУН ИМБИ,
кандидат биологических наук

Ануфриева Елена Валерьевна

Подпись Е.В. Ануфриевой
удостоверено
уч. секрет., к.б.н.



Полное название организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки «Институт морских биологических исследований
имени А.О. Ковалевского РАН» (ФГБУН ИМБИ)

299011, Севастополь, пр. Нахимова, д. 2

Телефон: (8692) 54-55-50; (8692) 54-41-10

E-mail: lena_anufrieva@mail.ru