

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Мурзиной Екатерины Дмитриевны «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 проблемы. Микроорганизмы, обитающие в экстремальных условиях, в настоящее время находятся в центре внимания исследователей. Изучение механизмов биохимической адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды, а также использование экстремофилов и экстремоферментов в биотехнологии является перспективным направлением.

Следует отметить, что выделенные из экстремальных экологических ниш микроорганизмы (экстремофилы) обладают огромным биотехнологическим потенциалом, так как хорошо адаптированы к неблагоприятным факторам окружающей среды. Ферменты, которые продуцируются этими микроорганизмами, обладают целым рядом ценных свойств, а именно повышенной активностью, стабильностью и могут функционировать при высоких температурах, концентрациях солей (галоферменты), в условиях высокой щелочности (алкалоферменты) и других экстремальных условиях (высокое давление, кислотность и т.д.).

Возможность широкого использования ферментов экстремофилов при разработке технологий способствует и тот факт, что они проявляют повышенную устойчивость не к одному, а к нескольким факторам среды.

В настоящее время наиболее исследованными являются экстремальные микроорганизмы галоархеи *Halobacterium salinarum*, которые служат источником витаминов, микроэлементов, галоцинов, специфических ферментов, фосфолипидов, С50 – каротиноидов и бактериородопсина.

Перспективными средствами доставки лекарств в организме являются археасомы *H. salinarum*. Широко применяются в косметической и фармацевтической в отраслях промышленности препараты на основе галобактерий.

В связи с этим диссертационная работа Е.Д. Мурзиной, в которой разработаны основы технологии получения биомассы *Halobacterium salinarum* на ферментативных гидролизатах зерновых, является актуальной.

Представленная к защите диссертационная работа включает введение, затем 3 главы, в которых описаны результаты исследований, выводы, список использованных источников и приложений. Содержание работы из-

ложено на 145 страницах машинописного текста, который включает 24 рисунков, 16 таблицы, 5 приложений. Список литературы содержит 264 источника.

Во введении обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследований, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

В обзоре литературы (первая глава) представлен анализ опубликованных 264 отечественных и зарубежных научных работ, в которых дается общая характеристика экстремально галофильных микроорганизмов. Показано, что экстремальные галофильные микроорганизмы являются природными источниками биологически активных веществ. Отмечены особенности культивирования галоархей и сохранение биомассы этих микроорганизмов.

Проведенный анализ публикаций позволил автору достаточно объективно сформулировать задачи для достижения поставленной цели в диссертации.

Во второй главе в соответствии с задачами для достижения цели автор обоснованно выбрал объекты и методы исследования.

Для исследований взят - непатогенный штамм галобактерий *H. salinarum* 353П (ВКПМ В-1739), полученный из ВКПМ ФГБУ «ГосНИИгенетика», и *H. salinarum* 353П-1 (ВКПМ В12794), выделенный в ходе исследований.

Следует отметить оригинальность методик. В частности, исследования в базовой питательной среде для галобактерий используется хлорид натрия 250 (г/л). Твердофазное культивирование галобактерий проводили в чашках Петри в течение 10-14 суток при 38,5 °С и в колбах в течении 7 суток и постоянном освещении лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 (500 Лк). Автором реализовано непрерывное культивирование галобактерий в биореакторе с мембранным модулем при высокой концентрации биомассы.

Для удаления ингибиторов/метаболитов, выделяемых галобактериями в ходе культивирования и влияющих на длительное хранение высушенной биомассы, осуществляли культивирование с адсорбентом – активным углем АГ-3, инкапсулированным в агар. Высушивание биомассы оптимизировали, используя искусственную нейронную сеть.

Полученные результаты исследований и их обсуждение представлено в третьей главе.

Автор уделил значительное внимание культивированию галобактерий на ферментолизатах зерновых, а именно, выбору ферментных препаратов, получению ферментолизатов зерновых, высокоплотностному культивированию в мембранном реакторе.

С целью длительного сохранения в нативном состоянии биомассы *H. Salinarum* и содержащихся в ней компонентов клеток автор предложил технологию распылительного высушивания биомассы галобактерий. Дальнейшая оптимизация параметров распылительной сушки проводилась с использованием искусственных нейронных сетей.

Полученные в процессе распылительной сушки сферические частицы инкапсулированных галобактерий, были изучены с точки зрения микробиологических и биохимических характеристик. Кроме того автором представлен анализ клеточной структуры образцов, высушенных на распылительной сушке. Автором изучена взаимосвязь условий и продолжительности хранения высушенных образцов с характеристиками реактивации.

В работе показано, что влияние протекторных агентов не оказывало существенного влияния на процесс высушивания и хранения биомассы.

Достоверность и обоснованность результатов и основных выводов диссертации. Содержащиеся в работе результаты исследований, выводы и рекомендации научно обоснованы, опираются на полученные автором экспериментальные данные и являются их логическим следствием. Заслугой соискателя является подбор и анализ большого массива научной литературы, среди которой две третьих списка принадлежит иностранным источникам.

В работе использованы современные, высокоинформативные физико-химические, химические, биохимические, биологические методы исследования, которые позволили автору исследовать и обосновать технологические параметры культивирования галобактерий на ферментолизатах зерновых.

С целью длительного сохранения в нативном состоянии биомассы *H. salinarum* и содержащихся в ней компонентов клеток предложить технологию распылительного высушивания биомассы галобактерий.

Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на международных и региональных научно-практических конференциях и съездах ученых.

По материалам исследований опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Автореферат и опубликованные научные работы полностью отражают содержание диссертации.

Научная новизна работы заключается в следующем.

В качестве источника углерода для культивирования галобактерий *H. salinarum* впервые использованы ферментолизаты зерновых культур.

Получена высокоплотностная культура, выращенная на ферментолизатах зернового сырья в мембранном биореакторе. Оптимизирован процесс распылительной сушки галобактерий *H. salinarum*.

Диссертация содержит научную новизну соответствующую пунктам 2,3,4 паспорта специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Практическая значимость. Разработан и проверен в лабораторных и промышленных условиях режим культивирования галобактерий *H. salinarum* на гидролизатах растительного сырья. Разработанная экспресс-методика определения каротиноидов позволяет определять содержание каротиноидов в процессе культивирования культуры. Оптимизирован процесс распылительной сушки, и оценено длительное хранение полученной биомассы. Получен акт внедрения результатов диссертации в производственный процесс. На штамм бактерий *H. salinarum* 353П-1 (номер ВКПМ В-12794), используемый для получения бактериальных препаратов, получен патент № РФ 2662996.

Автор рекомендует использовать для культивирования *H. salinarum* ферментоллизаты зерновых на основе пшеничной и ячневой круп, оптимальные для сохранности каротиноидов режимы распылительной сушки биомассы *H. salinarum* для получения высушенного продукта с остаточной влажностью.

Замечания по диссертационной работе. Вместе с тем, при рассмотрении диссертационной работы возникли вопросы и имеются замечания:

1. Обзор литературы проведен в основном по зарубежным источникам. Почему-то автор не сделал ссылок на отечественных исследователей. Следует заметить, что изучением возможности применения галофильных микроорганизмов в промышленности и, в частности, дрожжей *Debaryomyces hansenii* как источника кормового белка, занимались и продолжают в Казанском научно-исследовательском технологическом университета.

2. В представленной работе в качестве одного из объектов исследования автор использует галобактериальный штамм *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794). При этом автор подчеркивает непатогенность этого микроорганизма. Необходимо представить паспорт на данный объект исследования.

3. Необходимо пояснить с какой целью вводится глицерин в состав питательной среды для культивирования *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794).

4. При культивировании *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794) в колбах и биореакторе автор поддерживает освещение на уровне 500 Лк. Необходимо пояснить, как влияет освещение на эффективность культивирования данного объекта исследования и почему освещенность принята на уровне 500 Лк.

5. На стр. 79 автор указывает, что содержание сырого протеина определялось методом Къельдаля. И далее ферментные препараты Protex40E и Протосубтилин ГЗх задавались в процентах от содержания протеина в субстрате. Метод Къельдаля позволяет определить общее содержание азота и, соответственно, определить в сумме азот, принадлежащий истинному белку, небелковым органическим веществам, и минеральным веществам. В этой связи корректней задавать ферментные препараты в субстрат, исходя из содержания истинного белка. Это снизит расход ферментного препарата, что важно для промышленных условий получения продуктов.

Автор задает ферментные препараты в процентах к субстрату. Желательно представить расход в единицах активности к содержанию в субстрате истинного белка.

6. На стр. 81 автор констатирует, что содержание основного источника углерода для галобактерий выше в ферментолизатах пшеничной и ячменной круп. Следует ли понимать под основными источниками углерода аминокислоты? Едва ли дрожжевой экстракт и пептон по аминокислотному составу белков уступают белкам пшеничной и ячменной круп. Напрашивается вывод о том, что *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794) ассимилируют как аминокислоты, так и другие азотсодержащие органические вещества (возможно, рибонуклеиновые кислоты и т.п.), присутствующие в ферментолизатах пшеничной и ячменной круп. Возможно, это также положительно влияет на эффективность культивирования *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794) на ферментолизатах пшеничной и ячменной круп. Автору необходимо объяснить полученный результат.

7. Для удаления метаболитов при культивировании бактерий в колбах автор использует активный уголь. Однако, при культивировании бактерий в биореакторе в методике не указывается применение активного угля. Необходимо пояснить, каким способом удалялись метаболиты при культивировании в биореакторе.

8. В акте внедрения указано, что получена биомасса *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794) в опытно-промышленном производстве ООО «НИКОФАРМ». Однако, в акте не приведены показатели качества продукта и рекомендуемые оптимальные условия сушки и хранения биомассы.

9. В тексте автореферата и диссертации имеются опечатки.

Заключение. Указанные замечания не снижают научной ценности диссертационной работы Мурзиной Екатерины Дмитриевны «Основы технологии получения биомассы *Halobacterium salinarum* на ферментативных гидролизатах зерновых», которая является научно-квалификационной рабо-

той, выполненной на современном методическом уровне. Выводы и рекомендации диссертационной работы теоретически обоснованы. Представленные результаты исследований актуальны, имеют прикладное значение. Автором решены технические и технологические задачи производства бактериальных препаратов с высокой биологической активностью для применения в медицине, ветеринарии, животноводстве, косметологии.

Диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. от 01.10. 2018 г.), предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. Считаю, что Мурзина Екатерина Дмитриевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06- Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Официальный оппонент:

Кандидат технических наук,
доцент кафедры пищевой биотехнологии

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

420015, Российская Федерация,
Республика Татарстан,
Казань, ул. К. Маркса, 68,
E-mail:

zosya_kanarskaya@mail.ru
Телефон: +79600471908

Канарская Зося Альбертовна

Подпись

Канарской З. А.

удостоверяется.

Начальник ОКИД ФГБОУ ВО «КНИТУ»

О.А. Перельгина



05 20 18