

УТВЕРЖДАЮ

проректор по научно-инновационной деятельности



ФГБОУ ВО "Тамбовский государственный

технический университет",

д.т.н., профессор

Д.Ю. Муромцев

11

2020 г.

О Т З Ы В

ведущей организации ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет» на диссертацию Дерунец Алисы Сергеевны «Биологические основы совершенствования культивирования молочнокислых бактерий для разработки высокоэффективной технологии получения молочной кислоты», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

Актуальность темы диссертации

Молочная кислота (МК) является перспективным сырьем во многих отраслях промышленности: косметической, текстильной, фармацевтической, пищевой, химической и др. Однако, более частое использование молочной кислоты и получаемых из нее продуктов сдерживается относительно высокой ее себестоимостью. Значительный вклад в стоимость производимой МК вносит себестоимость питательной среды с дорогостоящими ростовыми факторами, как правило дрожжевым экстрактом. Вследствие этого, поиск альтернативных более дешевых источников сырья является актуальной проблемой, требующей решения.

Традиционно молочную кислоту получают при помощи периодического культивирования молочнокислых бактерий р. *Lactobacillus*. Несмотря на широкое их распространение в промышленности потенциал оптимизации режимов их культивирования, в том числе за счет использования оптимального сочетания стрессорных и антистрессорных факторов далеко не исчерпан. Поэтому исследования Дерунец А.С., посвященные разработке биологических основ совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты, применительно к высокоинтенсивным методам культивирования, с оптимизацией условий молочнокислого брожения являются своевременными и актуальными.

Актуальность работы подтверждается проведением при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ научных исследований в рамках гранта ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы», проекта

«Разработка новой отечественной комплексной технологии получения полилактида (биоразлагаемого полимера), базирующейся на биокаталитической переработке сахаросодержащего сырья», соглашение о предоставлении субсидии от 05.06.2014 г. № 14.577.21.0037, рег. № 114111140107.

Характеристика содержания диссертационной работы

Представленная к рассмотрению диссертационная работа включает введение, литературный обзор, экспериментальную часть, результаты исследований и их обсуждение, выводы, список литературы, включающий 322 источника, в том числе 303 зарубежных авторов. Работа изложена на 185 страницах, содержит 15 таблиц и 52 рисунка.

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, приведены научная новизна и практическая значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту, методология и методы исследования, представлены сведения о достоверности и апробации результатов исследования, приведены сведения о публикациях, структуре и объеме работы.

В первой главе приведен обзор методов получения и сфер применения молочной кислоты, описаны основные характеристики продуцентов, как молочнокислых бактерий, так и микроорганизмов, не относящихся к молочнокислым, проанализированы их достоинства и недостатки. С целью снижения себестоимости целевого продукта проанализированы методы интенсификации процесса культивирования и оптимизации состава питательной среды. Достаточно подробно описаны стрессовые воздействия на микроорганизмы: раскрыты их механизмы, приведены факторы, влияющие на адаптивность микроорганизмов, предложено несколько вариантов практического применения стрессовых воздействий с целью улучшения процесса биосинтеза молочной кислоты.

Во второй главе описаны объект, методы и материалы исследования. Приведены методы статистической обработки полученных экспериментальных данных.

Третья глава посвящена выбору оптимальных параметров состава питательной среды и исследованию влияния стрессового воздействия на основные показатели биосинтеза молочной кислоты. По результатам первой части исследований доказана возможность использования в качестве углеродсодержащего компонента питательной среды предварительно гидролизованной ёвекловичной мелассы, подобран качественный и количественный состав питательной среды, позволяющий накапливать максимальное количество молочной кислоты. Вторая часть исследований посвящена изучению стрессового воздействия на микроорганизмы с целью улучшения показателей культивирования. В ходе исследований установлена роль фотопарации в адаптации к оксидативному стрессу, определена сублетальная концентрация пероксида водорода, доказано наличие у *Lactobacillus paracasei* перекрестной адаптации в ответе на тепловой шок, оксидативный и осмотический стрессы. По

результатам исследований установлено, что адаптированная культура, культивируемая при видимом свете, синтезирует большее количество молочной кислоты при меньших количествах побочных продуктов, содержит наибольшее количество жизнеспособных клеток, чем адаптированная культура, культивируемая без света. Также установлено наличие у адаптированной культуры белка, участвующего в перекрестном стресс-ответе клетки.

Выводы по работе, отраженные в заключении, обобщают результаты исследований возможности совершенствования процесса биосинтеза молочной кислоты. Сформулированные выводы обоснованы и верно отражают суть проведенных исследований.

Диссертационная работа выполнена на достаточно высоком теоретическом и экспериментальном уровне, оформлена по установленным требованиям. Работа аккуратно оформлена, написана хорошим техническим языком. В ней использован большой объем научной литературы по рассматриваемой проблеме.

Автореферат диссертации выполнен с соблюдением установленных требований и правильно отражает содержание диссертации. Основные научные результаты и положения достаточно полно отражены в 12 научных работах, в том числе 1 статье в рецензируемом издании из перечня ВАК, 2 статьях в изданиях, индексируемых в международных базах данных SCOPUS и Web of Science, 9 публикациях в других изданиях и патенте РФ № 2712703.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов

Проведены теоретические и экспериментальные исследования процессов культивирования молочнокислых бактерий и биосинтеза молочной кислоты с точки зрения рационального сочетания состава питательной среды и направленного, контролируемого стрессового воздействия на популяцию клеток продуцента. Показано, что для совершенствования ферментационных процессов получения молочной кислоты контролируемое воздействие стрессорных (низких доз H_2O_2) и антистрессорных факторов (видимого света низкой интенсивности) может выступать в качестве средства для улучшения показателей биосинтеза с повышением выхода молочной кислоты на 2 - 5 %, снижения содержания побочных продуктов биосинтеза и остаточных компонентов питания. Стressированная пероксидом водорода культура становится чувствительной к воздействию небольших доз видимого света. Облучение видимым светом стрессированной культуры является необходимым условием для достижения положительных эффектов.

Показано, что воздействие H_2O_2 обусловлено физиологическими эффектами, а не протеканием сопутствующих химических или фотохимических процессов окисления с участием H_2O_2 .

Значимость результатов диссертации для науки и производства

На основе современных методов экспериментальных и теоретических исследований, математического моделирования получены новые научные результаты для теории совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты.

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научно обоснованные результаты теоретических и экспериментальных исследований биологических основ совершенствования культивирования молочнокислых бактерий для разработки высокоэффективной технологии получения молочной кислоты.

Практическое значение результатов диссертации

Автором изучены и критически анализируются известные достижения и теоретические положения других авторов по вопросам культивирования молочнокислых бактерий, влияния стрессовых факторов на жизнедеятельность молочнокислых бактерий и биосинтез молочной кислоты.

Соискателем доказано, что дрожжевой экстракт, как дорогостоящий источник ростовых факторов для роста молочнокислых бактерий, может быть заменен на существенно более дешевые соевые гидролизаты при снижении показателей выхода молочной кислоты и продуктивности лишь на 10 - 30 %.

Впервые для молочнокислых бактерий показано, что в условиях оксидативного воздействия пероксидом водорода микроорганизмы становятся чувствительными к видимому свету низкой интенсивности. В этих условиях возможно достижение положительных эффектов с точки зрения улучшения целевых показателей биосинтеза.

Автором определено, что культура молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei* B 4079, предадаптированная к оксидативному стрессу, в условиях освещения питательной среды видимым светом становится более устойчивой к тепловому шоку и осмотическому стрессу, т.е. в этих условиях наблюдается перекрестная адаптация к этим трем видам стрессорного воздействия. У адаптированной и неадаптированной к оксидативному стрессу культуры экспериментально определено наличие белка с молекулярной массой 54,2 кДа, что указывает на важную роль данного фактора в перекрестном стресс-ответе клетки, при этом различий в экспрессии данного белка в условиях освещения среды видимым светом и без освещения не выявлено.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Предложенные подходы к управлению процессом культивирования молочнокислых бактерий могут быть использованы при проектировании эффективных новых и совершенствовании действующих биотехнологических производств: биоразлагаемых термопластиков (полилактид), «зеленых растворителей» (этил-, пропил-, бутилацетаты) и окисленных химических веществ (пропиленгликоль).

Полученные результаты могут быть использованы в учебном процессе при подготовке специалистов по направлению «Биотехнология» в высших учебных заведениях Москвы, Санкт-Петербурга, Воронежа, Казани, Твери, Тамбова и др.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Теоретические исследования выполнены с использованием известных фундаментальных законов биологии и физической химии, кинетических закономерностей микробиологического синтеза и математических подходов.

Достоверность и обоснованность основных положений и выводов диссертации подтверждаются: 1) корректным использованием методологии научного исследования, объективных законов природы, методов физического и математического моделирования; 2) согласованностью теоретических результатов и экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов измерения и сертифицированных приборов, с известными литературными данными.

Положения теории основываются на известных достижениях фундаментальных и прикладных научных дисциплин: микробиологии, молекулярной биологии, биохимии, биотехнологии, системного анализа и математического моделирования. Достоверность экспериментальных данных обеспечивается применением современных методов измерения, сертифицированных приборов и экспериментального оборудования.

В работе автор грамотно использует математический аппарат при обосновании полученных результатов, выводов и рекомендаций. Обоснованность результатов, выдвинутых соискателем, основывается на согласованности данных лабораторных экспериментов и расчетных данных. Все это позволяет считать предложенный автором диссертации подход и полученные результаты, а также сделанные выводы установленными научными фактами.

Критические замечания

1. С чем связано снижение остаточного содержания компонентов питания при использовании соевого экстракта вместо дрожжевого?
2. Не понятно, на основании чего был выбран диапазон уровня освещенности на поверхности 300 - 3000 Лк, способствующий фотопарации. Каким образом осуществлялось освещение колб и ферментера Minifors (схема не приведена) и чем вызвано изменение уровня освещения колб (300 - 3000 Лк) и ферментера (10800 Лк)?
3. Из каких соображений при отборе устойчивых к пероксиду водорода культур молочнокислых бактерий путем последовательных пассирований в колбах концентрация глюкозы (100 - 110 г/л), соответствующая среде MRS, была снижена до 30 г/л и увеличена до 200 г/л при неизменном содержании остальных компонентов?
4. Не ясно, какое количество пассажей рекомендуется для преадаптации молочнокислых бактерий к воздействию H_2O_2 и как должна соотноситься концентрация глюкозы на стадии преадаптации с концентрацией глюкозы на стадии синтеза молочной кислоты.
5. На рис. 40 представлено сопоставление показателей роста в условиях теплового шока. Чем объясняется сильное различие в потреблении глюкозы для образцов 1 - 4

при очень близких значениях показателей по биомассе и концентрации молочной кислоты?

6. В задаче 6 работы планировалась разработка рекомендаций по использованию результатов диссертационных исследований для технологического расчета и оптимизации мембранных биореакторов. Однако расчетов биореактора приведено не было.

7. Технические замечания:

Не понятно, почему в графиках на рисунках 42 - 45 в качестве величин, отложенных по оси ординат, указаны концентрации сахарозы и NaCl, имелась ли в виду оптическая плотность?

В п. 3.2.8 при исследовании внутриклеточного пула белков стрессированной и нестressedированной культур МКБ не указано, при каких условиях проводилась преадаптация культуры и процесс культивирования.

В диссертации при описании уровней освещенности фигурировали величины освещения колб (300 - 3000 Лк) и ферментера 10800 Лк (300 - 3000 Лк), при этом в выводах по работе появляется диапазон (30 - 3000 мВт/л).

Отмеченные недостатки не влияют на основные теоретические и практические результаты диссертации. Диссертация написана соискателем самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, что свидетельствует о личном вкладе автора диссертации А.С. Дерунец в науку.

Заключение

По тематике, содержанию, методам исследования диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.01.06 – "Биотехнология (в том числе бионанотехнологии):

формуле специальности: «область науки об использовании живых организмов и биологических процессов в производстве с целью получения полезных продуктов для народного хозяйства, целенаправленно улучшающих воздействие на окружающую среду»;

областям исследования: «исследование и разработка требований к сырью (включая вопросы его предварительной обработки), биостимуляторам и другим элементам, оптимизация процессов биосинтеза», «изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения».

Считаем, что диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 действующего «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 28.08.2017), а

ее автор Дерунец Алиса Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» за самостоятельно выполненную научную работу, в которой изложены новые научные решения – биологические основы совершенствования культивирования молочнокислых бактерий – для разработки высокоэффективной технологии получения молочной кислоты, имеющие существенное значение для развития страны.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсуждены на заседании кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет».
«3» ноября 2020 г., протокол № 11.

Зав. кафедрой ТОПХП

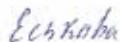
доктор технических наук (05.17.08, 05.13.01),

профессор


5.11.20

Дворецкий Дмитрий Станиславович

Секретарь

 5.11.20

М.А. Еськова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный технический университет»
392000, г. Тамбов, ул. Ленинградская, 1
тел.: 8(4752) 63-94-42
e-mail: dvoretsky@tambov.ru

Подписи заверяю



Г.В. Мозгова

Ученый секретарь Ученого
Совета ФГБОУ ВО «ТГТУ»