

## О Т З Ы В

официального оппонента Исаковой Елены Павловны  
на диссертационную работу Дерунец Алисы Сергеевны  
**«Биологические основы совершенствования культивирования  
молочнокислых бактерий для разработки высокоэффективной  
технологии получения молочной кислоты»**  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе  
бионанотехнологии)

### Актуальность темы диссертации.

Актуальность диссертационной работы Дерунец А.С. не вызывает сомнений, поскольку данное исследование посвящено перспективной и конкретной теме оптимизации технологии получения молочной кислоты, одной из наиболее востребованных в различных областях промышленности, а именно, косметической, текстильной, фармацевтической, пищевой, химической, при синтезе биодеградируемых полимеров, некоторых органических растворителей и ряда ценных химических соединений. Однако широкое распространение молочной кислоты и получаемых из нее продуктов сдерживается их относительно высокой себестоимостью.

На сегодняшний день наиболее рациональным способом получения молочной кислоты считается микробиологический синтез при помощи молочнокислых бактерий. Традиционно для получения молочной кислоты проводят периодическое культивирование молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* на комплексных питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины и дополнительные факторы роста, источником которых служат растительные, животные, дрожжевые гидролизаты и экстракты. Как правило, с этой целью используется достаточно дорогой дрожжевой экстракт, вносящий существенный вклад в себестоимость молочной кислоты. Кроме того, недостатками практикующегося в настоящее время способа биосинтеза молочной кислоты (простого периодического

культивирования) является низкая продуктивность процесса брожения, а также образование в процессе нейтрализации и выделения молочной кислоты значительного количества побочных продуктов, в частности, сульфата кальция.

Несмотря на то, что такой способ получения молочной кислоты в настоящее время наиболее распространен наряду с полунепрерывными (отъемно-деливное культивирование) и непрерывными методами, потенциал оптимизации режимов культивирования, разработка методов устойчивости популяции продуцента к негативным воздействиям разного характера, управление стрессовым воздействиями с использованием оптимального сочетания стрессорных и антистрессорных факторов далеко не исчерпан.

Дерунец А.С. развила и оптимизировала новаторскую идею процесса биосинтеза молочной кислоты с использованием мембранных биореакторов, разработанного на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева, что позволило значительно удешевить себестоимость молочной кислоты и сократить время культивирования. Таким образом, **актуальность** работы не подлежит сомнению. В ходе исследований, проведенных Дерунец А.С., было показано, что оптимальное сочетание стрессорных и антистрессорных факторов может служить рациональным способом совершенствования биосинтеза молочной кислоты.

**Целью** представленной работы являлась разработка биологических основ для совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты с использованием высокоинтенсивных методов культивирования с применением более дешевых питательных сред и повышением резистентности продуцента к условиям стресса.

### **Научная новизна научных исследований**

Результаты работы, проведенной по теме диссертации имеют высокую фундаментальную и научно-практическую ценность, поскольку вносят вклад в понимание процессов культивирования молочнокислых бактерий и

биосинтеза молочной кислоты с точки зрения рационального сочетания состава питательной среды и направленного и контролируемого стрессового воздействия на популяцию клеток продуцента. Такие исследования на примере продуцента *Lactobacillus paracasei* B 4079 были проведены впервые.

Также впервые было убедительно доказано, что воздействие  $H_2O_2$  обусловлено физиологическими эффектами, а не протеканием сопутствующих химических или фотохимических процессов окисления с участием  $H_2O_2$ .

Были проведены работы по совершенствованию ферментационных процессов получения молочной кислоты при использовании контролируемого воздействия стрессорных факторов (низких доз  $H_2O_2$ ) и антистрессорных факторов (видимого света низкой интенсивности). Было показано, что подобное воздействие 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.

### **Научно-практическая значимость**

Результаты работы, проведенной по теме диссертации, имеют важное практическое значение, способствуя расширению спектра более дешевых и ингредиентов для питательных сред в качестве альтернативы дрожжевому экстракту для получения молочной кислоты с помощью бактерий *Lactobacillus paracasei*, что позволяет снизить остаточное содержание компонентов питания и побочных продуктов биосинтеза, что важно для снижения себестоимости молочной кислоты, ее очистки и выделения, снижения потерь и повышения выхода получаемых из нее продуктов, в частности, полилактида.

Анализ полученных результатов позволил диссидентанту предложить рекомендации для совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты применительно к высокоинтенсивным и экономически рациональным методам культивирования, в частности, отъемно-деливному культивированию в мембранным биореакторе.

В 2020 г был получен патент на способ культивирования молочнокислых бактерий для получения молочной кислоты получен (Дерунец, Кузнецов, патент РФ № 2712703), что подтверждает практическую значимость и эффективность данной разработки. Технический результат настоящего изобретения заключается в получении L-молочной кислоты с выходом 97-98%.

### **Объем и структура диссертационной работы.**

Диссертация изложена на 185 страницах текста. Литературный обзор включает анализ большого числа как отечественных, так и зарубежных источников. Кроме обзора литературы в диссертации представлены введение, описание объекта и методов исследования, главы с полученными результатами и их обсуждением, выводы, список литературы (322 источников). Иллюстративный материал включает 52 рисунка и 15 таблиц.

Во **введении** подробно изложена актуальность заявленной работы, общая картина современного состояния разрабатываемой проблемы, выстроена логика формулирования цели работы и постановки задач.

**Литературный обзор**, представленный автором, информативен, широко освещает проблемы, рассматриваемые в диссертации, состоит из восьми основных разделов и написан крайне обстоятельно. В частности, в нем рассматривается характеристика продуцентов молочной кислоты, имеющих различную таксономическую групповую принадлежность - бактерии, грибы, дрожжи, водоросли, а также смешанные культуры, генетически модифицированные микроорганизмы. Описаны особенности биосинтеза и регуляции метаболизма у молочнокислых бактерий, традиционные методы биосинтеза молочной кислоты, ее очистки и выделения, получение молочной кислоты при помощи иммобилизованных клеток. Большое внимание уделено описанию различных стрессовых воздействий и их регуляции. Подбор литературы логичен и отражает задачи исследований.

В главе **объекты и методы исследования** дана характеристика объекта исследования, описаны использовавшиеся материалы и методы. Для решения поставленных задач были использованы адекватные, современные методы физико-химической биологии, что позволило диссертанту эффективно проводить исследования такого уровня. Все полученные экспериментальные данные подвергнуты математической обработке.

**Экспериментальная часть** работы последовательно разбита на две части, согласно поставленным задачам, каждая из которых, в свою очередь, состоит из четырех и восьми разделов. Проведенные автором исследования логичны и последовательны. Иллюстративный материал наглядно отражает результаты экспериментов.

Показано, что основным недостатком процесса получения молочной кислоты культивированием *L. paracasei* на свекловичной мелasse является низкая физиологическая активность данного штамма по отношению к сахарозе, и это обуславливает необходимость поиска более благоприятного субстрата.

Установлено, что при замене в ферментационной среде глюкозы на свекловичную мелассу, продуктивность процесса синтеза молочной кислоты снижается в 5 раз, но предварительная стадия гидролиза мелассы позволяет повысить продуктивность периодического процесса до 4,7 г/л\*ч, степень конверсии углеводов при этом сопоставима с показателями, достигаемыми при использовании глюкозы. Кроме того, для снижения себестоимости ферментационной среды дрожжевой экстракт может быть заменен более дешевыми источниками азота и ростовых факторов соевыми гидролизатами.

Была проведена оптимизация компонентов питательной среды по составу и концентрации с использованием полного факторного эксперимента. Варьируемыми факторами при этом являлись концентрации компонентов питательной среды: глюкозы, источника азота, фосфатов, солей марганца и

магния. При двухуровневом варьировании число проводимых опытов  $N$  составило 32.

Показано, что оптимальное стрессовое воздействие малых доз пероксида водорода с одновременным освещением видимым светом ферментационной среды с преадаптированными к окислительному стрессу молочнокислыми бактериями может повысить выход молочной кислоты на 2–5%, повысить устойчивость процесса культивирования к тепловому и осмотическому стрессу при отклонении технологических параметров от оптимальных, например, при нарушении температурного режима в пределах субкритических значений.

Рассмотрена перекрестная адаптации лактобацилл *L. paracasei* B 4079 к стрессорным факторам:

- у исследуемой культуры возникает перекрестный ответ на оксидативный стресс и тепловой шок;
- между окислительным стрессом и голоданием перекрестного ответа вероятнее всего не возникает;
- между оксидативным стрессом и осмотическим стрессом перекрестный ответ наблюдается;
- возникновение светочувствительности отмечено только для культуры, подверженной стрессорному воздействию.

Диссертация хорошо проиллюстрирована, изложена четко и логично. Таблицы и рисунки занимают на ее страницах соответствующее место, всегда согласующееся с излагаемым текстом. Количество рисунков и таблиц говорит о выполнении большой и серьезной работы. Встречающиеся опечатки малочисленны и почти неизбежны при компьютерном наборе большого текста.

Обсуждение полученных диссидентом результатов представляется достаточно обстоятельным и подкрепленным обширным иллюстративным

материалом, что позволяет считать представленную работу законченным и экспериментально подтвержденным трудом. Выводы, сделанные автором, теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены, написаны емко и полностью отражают полученные в исследованиях результаты.

Сделанные мной замечания носят не столько критический, сколько рекомендательный характер и имеют отношение главным образом к формулировкам и терминологии:

1. Несмотря на то, что исследования оксидативного стресса достаточно широко освещены, нет теоретического и экспериментального обоснования для выбора диапазона освещенности 300 - 3000 Лк, кроме того не приведена схема освещения колб и ферментера Minifors и чем при этом обусловлено изменение уровня освещенности.
2. Не приведены доказательства наличия окислительного стресса при использовании перекиси водорода. Нет информации об уровне активных форм кислорода, свидетельствующих о наличии окислительного стресса в культуре. Желательно в следующих работах провести исследования по их определению.
3. При проведении контролируемого стресса докторант использовала освещение низкой интенсивности как значимый фактор улучшения показателей биосинтеза молочной кислоты. При этом нет никакой информации или предположений о возможном механизме влияния освещенности на преадаптированную культуру, в частности, в условиях окислительного стресса.
4.  
Также отсутствуют четкие рекомендации по количеству пассажей наиболее оптимальном для преадаптации молочнокислых бактерий к воздействию  $H_2O_2$ .
5. Неясно при каких условиях была осуществлена преадаптация культур и сам процесс культивирования для образцов культур, использовавшихся при

исследовании внутриклеточного пула белков стрессированной и нестрессированной культур молочнокислых бактерий.

6. Все данные, представленные на рисунках и таблицах, указаны без погрешностей и доверительных интервалов.
7. В главе методы и материалы недостаточно подробно описаны среды выращивания и сам процесс подготовки инокуляции и культивирования
8. В таблице 1 указано время культивирования на необработанной мелasse (71 час) и выход молочной кислоты (96%) от теоретически возможной, в то время как в тексте написано, что выращивание на этом субстрате занимает не менее 116,5 часов, а при этом накопление молочной кислоты значительно ниже.
9. На рис 9 автореферата показаны зависимости накопления биомассы и молочной кислоты в различных условиях, а в тексте говорится о кривой потребления субстрата. Кроме того, из кривых видно, что уровень накопления молочной кислоты в различных условиях очень близок по значениям, а значительная разница видна лишь в количестве полученной биомассы.

Очевидно, что высказанные замечания и вопросы не снижают моей высокой оценки работы, которая демонстрирует профессионализм автора и его высокую научную квалификацию. Диссертация по совокупности представленного в ней материала оставляет очень хорошее впечатление.

Диссидентом проделана актуальная и современная работа, теоретическая и практическая значимость которой, а также достоверность полученных диссидентом данных не вызывает сомнений.

Проведенные Дерунец А.С. анализ и обобщение результатов исследований позволяют в полной мере обосновать основные положения, выносимые на защиту. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований, полученные результаты имеют несомненную практическую ценность.

**Основные положения диссертационной работы** представлены в 11 публикациях, в том числе в статье в журнале, рекомендованном ВАК РФ, 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных SCOPUS и Web of Science, а также публикации в других изданиях (8 научных работ). Результаты работы были апробированы на конференциях международного уровня. Публикации дают полное представление о выполненной работе. Автореферат в целом отражает содержание диссертации.

### **Апробация работы.**

Основные результаты работы представлены на международных и всероссийских конференциях, в том числе на X, XI и XII Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, «МКХТ – 2014, 2015, 2016»), на Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014), на Российско-Швейцарском семинаре «От фундаментальных исследований к коммерциализации научных идей» (Москва, 2016), на Конкурсе молодых ученых «Прикоснись к науке» в рамках Фестиваля науки в Менделеевском университете (Москва, 2016), на XVII Ежегодной молодежной конференции «Биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2017), на XII Международном биотехнологическом Форуме-выставке «РосБиоТех-2018» (Москва, 2018), 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018 (Вена, 2018).

Диссертация является завершенной научно-квалификационной работой, посвященной решению актуальной проблемы.

Автореферат в достаточной мере отражает содержание диссертации.

Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), представляет собой законченную научно-квалификационную работу, актуальность, используемые способы решения поставленных задач, а также значимость полученных результатов которой не вызывает сомнений.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа «Биологические основы совершенствования культивирования молочнокислых бактерий для разработки высокоэффективной технологии получения молочной кислоты» по своей актуальности, степени научной новизны, теоретической и практической ценности полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Дерунец Алиса Сергеевна заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Исакова Елена Павловна,  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник лаборатории  
экологической и эволюционной биохимии,  
«ФИЦ «Фундаментальные основы  
биотехнологии» РАН»  
119071 г. Москва, Ленинский проспект,  
дом 33, строение 2  
тел.: +7 (495) 952-25-47  
e-mail: [elen\\_iss@mail.ru](mailto:elen_iss@mail.ru)

Исакова  
Елена  
Павловна



Подпись Исаковой Елены Павловны заверяю:



30 ноября 2020 г.

