

О Т З Ы В

официального оппонента доктора биологических наук Л.Г. Стояновой 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

Молочная кислота является конечным продуктом гликолиза, осуществляемого путем сбраживания углеродсодержащих субстратов с использованием различных микроорганизмов: бактерий, грибов, дрожжей (Abdel-Rahman et al., 2013), а также смешанных культур *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis* (Cui, Wan, 2011). Присутствие гидроксильной и карбоксильной групп в молекуле молочной кислоты позволяет участвовать в самых разнообразных химических реакциях, таких как этерификация, конденсационная полимеризация, гидратация (восстановление) и замещение, и это обеспечивает ее огромный потенциал при использовании в качестве предшественника для целого ряда промышленных продуктов и изготовления потребительских товаров. Она широко используется в ряде отраслей нашей промышленности, а именно: в пищевой, химической (комплексообразующие агенты, термопластические полимеры), в фармацевтике (диализные растворы, хирургические нити) (Wee et al., 2006). В настоящее время молочную кислоту получают микробиологическим синтезом. Объем микробиологически синтезированной молочной кислоты, необходимый для использования в вышеперечисленных сферах промышленности, оценивается на данный момент в 250 000 т/год.

Традиционно для получения молочной кислоты используются периодический способ культивирования, но который характеризуется низкими концентрациями биомассы, а также низкой продуктивностью из-за возможного ингибирования процесса субстратом и /или конечным продуктом. Для решения этих проблем обычно используют другие способы, а именно: культивирование с подпитками, культивирование с рециклом по биомассе и непрерывное культивирование. Тем не менее, каждый из этих методов имеет некоторые ограничения, и на дальнейшее их развитие для создания эффективного производства направляются большие усилия.

Воздействие сублетальных концентраций стрессовых факторов вызывает ряд адаптивных ответных реакций, направленных на преодоление стресса, что позволяет продуцентам изменять синтез определенных метаболитов, лучше адаптироваться к стрессу, и тем самым привести к определенным положительным эффектам, что может использоваться для совершенствования этого микробиологического синтеза.

Эффективность процесса биосинтеза главным образом зависит от микроорганизма-продуцента, стоимости субстрата и режимов культивирования.

Молекула молочной кислоты ассиметрична и поэтому может существовать в двух оптически изомерных формах: правовращающаяся (L-молочная) и левовращающаяся (D-молочная). L-изомер в природе встречается чаще. Согласно US FDA (Food and Drug Administration) чистая L-молочная кислота официально признана безвредной пищевой добавкой (E 270, E 325, E 326, E 327), в то время, как D-лактат может оказывать вредное воздействие на метаболизм человека, вызывать ацидоз и декальцификацию. Молочнокислые бактерии могут синтезировать одновременно как оба стереоизомера, так и каждый из них по отдельности.

Проведенные ранее эксперименты показали, что рациональным способом совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты может быть управление стрессовыми воздействиями, в частности, оптимальное сочетание стрессорных и антистрессорных факторов. Такой подход получил название контролируемого стресса, частным примером которого является контролируемый оксидативный стресс, использующий воздействие малых доз пероксида водорода и видимого света низкой интенсивности на популяцию продуцентов. Стрессовые воздействия в ряде случаев позволяют существенно улучшить показатели биосинтеза (Басконьяк,2003; Papadimitriou et al.,2016) .

Цель исследования - разработка биологических основ для совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты применительно к высокоинтенсивным методам культивирования, с использованием относительно дешевых питательных сред и повышением устойчивости популяции продуцента к стрессовым воздействиям, рациональным управлением стрессом.

Для реализации данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определение основных характеристик и показателей процесса культивирования молочнокислых бактерий с отобраным продуцентом из рода *Lactobacillus*.
2. Оптимизация состава питательной среды, прежде всего с точки зрения замены дорогостоящего дрожжевого экстракта на менее дорогие источники азота и ростовых факторов.
3. Определение границ устойчивости процесса (влияние голодания, концентрации субстрата, протока среды, pH).
4. Изучение влияния стрессовых условий на изменение характеристик культуры молочнокислых бактерий, в частности, в условиях контролируемого оксидативного, осмотического стресса и теплового шока.
5. Определение подходящих условий культивирования при комбинированном действии оксидативного стресса и видимого света низкой интенсивности.
6. Разработка рекомендаций к совершенствованию биосинтеза молочной кислоты применительно к использованию высокоинтенсивных и малозатратных ферментационных процессов, в частности, мембранного биореактора.

Структура диссертационной работы Дерунец А.С. "Биологические основы совершенствования культивирования молочнокислых бактерий для разработки высокоэффективной технологии получения молочной кислоты" традиционная. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, выводов, списка использованной литературы, включающего 322 источника, в том числе 303 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 185 страницах текста, иллюстрирована 52 рисунками, 15 таблицами.

Во введении обоснована актуальность исследования, цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость.

В первой главе приведен обзор научно-технической литературы, в котором дана характеристика продуцентов молочной кислоты различных таксономических групп - бактерии, грибы, дрожжи, водоросли, а также смешанные культуры, генетически модифицированные микроорганизмы.

В следующем разделе рассмотрены условия культивирования продуцентов, различные аспекты воздействия стрессовых факторов на рост и физиолого-биохимические характеристики продуцентов молочной кислоты, аппаратное оформление и технологические решения при осуществлении микробиологического синтеза, выделения и очистки молочной кислоты. Отмечены экономические и экологические аспекты.

Подбор литературы логичен, обзор написан хорошим литературным языком, отражает задачи исследований и помогает правильно интерпретировать результаты, полученные автором.

Во второй главе «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов и методам исследования.

Объектом исследования отобран штамм молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* В-4079 из ВКПМ (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика).

Выбор подходящего продуцента обусловлен задачами работы и основывался на способности штамма полно использовать субстрат, накапливать максимальное количество целевого с высокой скоростью, быть устойчивым к высоким концентрациям молочной кислоты. Оптимизация количества компонентов питательной среды проведен с использованием полного факторного эксперимента.

Управляемое культивирование продуцента проводили в условиях голодания по субстрату, пониженной концентрации ростовых факторов, повышенной плотности популяции, пониженной концентрации ростовых факторов, снижения рН, теплового и осмотического шока, ингибирующего действия молочной кислоты, при воздействии стрессорных факторов (низких доз H₂O₂) и антистрессорных факторов (видимого света низкой интенсивности).

Для решения поставленных задач диссертантом были привлечены новые современные микробиологические, молекулярно-генетические, биохимические, химические методы в свете последних научных исследований. Оптимизация биотехнологических процессов осуществлялась с применением математических методов планирования. Оптимизация количества компонентов питательной среды проведена с использованием полного факторного эксперимента. При двухуровневом варьировании число проводимых опытов N составило 32.

Статистическая обработка результатов исследований проведена с привлечением современных методов математической обработки результатов – с применением компьютерных программ MS Excel и STATISTICA

В третьей главе представлены результаты и их обсуждение.

При изучении влияния основного компонента среды на биологическую активность штамма молочнокислых бактерий *L. paracasei* subsp. *paracasei* В-4079 было показано, что основным недостатком процесса получения молочной кислоты при культивировании штамма В-4079 на свекловичной мелассе является его низкая физиологическая активность по отношению к сахарозе, что обуславливает необходимость поиска благоприятного субстрата. Полагая, что процесс ассимиляции мелассы может быть лимитирован активностью фермента инвертазы, для интенсификации процесса брожения исследовали процесс культивирования данного штамма в периодических условиях ферментации на предобработанной питательной среде.

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. Для снижения себестоимости ферментационной среды дрожжевой экстракт может быть заменен более дешевыми источниками азота и ростовых факторов - соевыми гидролизатами.

Подход к совершенствованию управляемого культивирования микроорганизмов на основе целенаправленного сочетания стрессорных и антистрессорных воздействий был назван «контролируемым стрессом», «контролируемым оксидативным стрессом». Такой подход к управляемому культивированию микроорганизмов разрабатывается на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева, начиная с 2000-х гг. В качестве одного из вариантов, технологически рациональных и приемлемых для практической реализации, используется контролируемое совместное воздействие оптимальных доз различных активных форм кислорода, в частности, H_2O_2 и видимого света низкой интенсивности. Рассмотренные выше примеры различных перекрестных реакций

между системами ответа на стресс, в том числе оксидативный, а также репарации, включая фоторепарацию, также свидетельствуют в пользу возможного приобретения светочувствительности стрессированных популяций, которые в нормальном физиологическом состоянии нечувствительны к видимому свету. Таким образом, возникающая светочувствительность при воздействии стрессоров может быть использована для расширения возможностей управляемого культивирования нефототрофных микроорганизмов, в частности, путем комбинирования воздействия стрессорными факторами и светом. В этой связи заслуживают внимания данные о положительном действии стресса на отдельные показатели роста и биосинтеза, выживаемости клеток, что может быть использовано на практике.

Оптимальное стрессовое воздействие малых доз пероксида водорода с одновременным освещением видимым светом ферментационной среды с преадаптированными к оксидативному стрессу молочнокислыми бактериями увеличило выход молочной кислоты на 3–5%, повысило устойчивость процессов культивирования при отклонении технологических параметров от оптимальных, например, при нарушении температурного режима в пределах субкритических значений.

Способ получения молочной кислоты, заключающийся в культивировании молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei* ВКПМ В-4079, адаптированных к агенту оксидативного стресса H_2O_2 на фоне освещения питательной среды с клетками продуцента видимым светом низкой интенсивности (30-300 мВт/л) обеспечивает высокий выход целевого продукта - молочной кислоты (патент РФ № 2712703, 2020г), что подтверждает научную новизну и эффективность данной разработки. Технический результат настоящего изобретения заключается в получении L-молочной кислоты с выходом 97-98%.

Практическая значимость состоит в том, что подбор оптимальных концентраций компонентов питания, использование соевых гидролизатов в качестве альтернативы дрожжевому экстракту с использованием бактерий *Lactobacillus paracasei* позволило снизить себестоимость производства молочной кислоты. Разработаны рекомендации для совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты применительно к высокоинтенсивным и экономически рациональным методам культивирования, в частности, отъемно-доливному культивированию в мембранном биореакторе.

Вместе с тем представленная диссертация **не лишена отдельных недостатков, касающихся, главным образом, оформления работы.**

Имеются отдельные опечатки в тексте, которые легко можно устранить

1. *Lactobacillus delbrueckii* **subsp. bulgaricus** — подвид *Lactobacillus delbrueckii*. Ранее (до 2014 года) бактерия известна как вид *Lactobacillus bulgaricus*, сейчас по систематике - *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *vulgaricus*.

2. *Salmonella typhimurium* надо писать *Salmonella Typhimurium* как серовар *Salmonella enterica* (новая систематика).

3. Эффективность процесса биосинтеза молочной кислоты зависит от физиолого-биохимических особенностей микроорганизма-продуцента. В обсуждении результатов не отмечено, какие побочные продукты могут образовываться в процессе ферментации отобранного для исследований продуцента *L. paracasei* В-4079. Данный вид лактобацилл успешно используются для получения оптически чистого L-лактата в анаэробных условиях, однако при этом могут синтезироваться в небольших количествах и такие побочные продукты, как сукцинат и ацетат (Okino et al., 2005). Возможен синтез изомера D-лактата.

4. В представленных таблицах и рисунках желательно привести доверительный интервал, который можно указать хотя бы в сносках ($p \leq 0.05$).

5. В **Выводах** целесообразно представить полученные экспериментальные данные в количественном измерении и привести пункты в соответствие с поставленными задачам диссертационной работы. Можно было бы пункт 1 дополнить указанием на полученный **патент** (патент РФ № 2712703 от 2020г.) и разработанные автором **Рекомендации**, а пункты 3 и 4 объединить.

Однако, указанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают значимости полученных результатов. Соискателем выполнена интересная и своевременная работа, актуальность, новизна, теоретическая и практическая ценность которой неоспоримы. Результаты подвергнуты обработке методами математической статистики, что и позволило автору выявить закономерности и корреляционные зависимости. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений.

Проведенные диссертантом анализ и обобщение результатов комплексных научных исследований позволили полностью обосновать основные положения, выносимые на защиту. **Выводы**, представленные в работе, отражают основные результаты исследований.

По теме диссертации **опубликовано** 11 научных работ, в том числе 1 статья в рецензируемых изданиях, 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных SCOPUS и Web of Science, а также публикации в других изданиях (8 научных работ). Публикации дают полное представление о выполненной работе.

Апробация работы.

Основные результаты исследований неоднократно обсуждались на многочисленных семинарах, Всероссийских и Международных научных конференциях.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 «Биотехнология» (в том числе бионанотехнологии).

Диссертация Дерунец А.С. представляет собой обстоятельный и завершённый труд, в которой содержится решение имеющей важное социально-экономическое значение научной проблемы по разработке высокоэффективной технологии получения молочной кислоты.

Имеются все основания утверждать, что автор полностью реализовал поставленные цели и задачи.

В целом, 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).

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, доцент
ведущий научный сотрудник кафедры
микробиологии ФГБОУ ВО

«Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»

119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12;

Биологический факультет

тел. +7(495)939-45-45

e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Л.Г. Стоянова

Подпись. Стояновой Лидии Григорьевны заверяю:

Декан биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»
академик



М.П. Кирпичников

24 ноября 2020 г.