

О Т З Ы В

официального оппонента Дворецкого Дмитрия Станиславовича на диссертационную работу Кузнецова Александра Евгеньевича

«Высокоэффективные экологически чистые совмещенные системы микробиологического синтеза и очистки сточных вод с оксидативным стрессовым воздействием», представленную на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

Представленная работа посвящена системному рассмотрению и совершенствованию подходов, направленных на повышение эффективности микробиологического культивирования, переработки отходов и очистки сточных вод на основе оптимального совмещения по месту и времени микробиологических и абиотических процессов в условиях контролируемых стрессорных и антистрессорных воздействий.

Справедливо отмечается, что несмотря на значительные успехи в создании более совершенных технологий культивирования микроорганизмов, на эту ключевую стадию по-прежнему приходится от 10 до 90 % затрат в себестоимости продукции, и она имеет значительный потенциал для дальнейшего совершенствования.

Проведенные исследования направлены на решение актуальной проблемы, присутствующей при разработке технологий и проектировании современных биотехнологических производств, - создание предприятий в соответствии с концепцией устойчивого развития общества, обеспечивающих минимальные уровни себестоимости продукции и образующихся отходов, требующих отдельной переработки или обезвреживания. В качестве перспективных вариантов для разработки методологии создания экологически чистых производств микробиологического синтеза, биодеструкции и биологической очистки были использованы решения, которые воспроизводят или моделируют процессы, протекающие в природных средах. Актуальными являются вопросы практического применения апробированных в лабораторных условиях подходов, основанных на предложенных принципах, для разработки технологий и оборудования действующих производств.

Цель работы заключалась в разработке и обосновании научных основ совершенствования микробиологических процессов культивирования путем воспроизведения совмещенных процессов при построении биотехногенных экосистем по принципам функционирования природных экосистем.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, изложенных на 708 страницах, заключения и 5 приложений. Список литературы включает 1941 наименование работ, из них 1726 работ зарубежных авторов.

Во введении обоснована актуальность исследования, представлены цель и задачи работы, сформулированы принципы рационального совершенствования ферментационных процессов: сочетания по месту и времени абиотических и биотических реакций, выбора факторов, обеспечивающих условия самоочищения, оптимального подбора управляющих стрессовых воздействий на популяции микроорганизмов.

В обзоре литературы, включающем первые две главы, автор очень обстоятельно проанализировал и обобщил положение дел в области современных исследований, направленных на совершенствование процессов ферментации, биологической очистки сточных вод, изучение механизмов различных стрессовых воздействий на микроорганизмы. Подробно рассмотрены наиболее эффективные способы организации процессов ферментации и биологической очистки сточных вод, варианты использования мембранных биореакторов. Большое внимание было уделено способам культивирования с совмещением химических, фотохимических и биологических реакций и использованием абиотических природных процессов самоочищения с участием активных форм кислорода.

На основе анализа различных стрессовых воздействий выдвигается гипотеза о том, что особенности ответа на стрессовое воздействие у популяций клеток микроорганизмов создают предпосылки и основу для постановки задачи поиска режимов управляемого культивирования микроорганизмов. Вводится понятие контролируемого (оксидативного) стресса - метода управления биопроцессом посредством совместного действия стрессоров и антистрессоров, направленных на оптимальное протекание сопряженных микробиологических, химических и фотохимических реакций. Было обращено внимание, что на фоне воздействия малых, сублетальных доз H_2O_2 микроорганизмы могут стать чувствительными к низким дозам видимого света.

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

В третьей главе представлено описание и обоснование выбора микробиологических объектов, использованных в экспериментальных исследованиях (характеристики и особенности микроорганизмов для получения целевых продуктов и биологической очистки сточных вод).

При исследовании процесса брожения для получения молочной кислоты был сделан акцент на разработку технологии, которая предусматривала получение нативного раствора лактата аммония из различных видов сахаросодержащего

сырья для последующего получения полилактида и/или других продуктов на основе молочной кислоты. Показано, что актуальной задачей при микробиологическом получении молочной кислоты является снижение затрат на питательные субстраты (дорогостоящие ростовые факторы), а также повышение продуктивности биореактора, обеспечение высокого выхода и конечной концентрации молочной кислоты, снижение содержания побочных компонентов нативных растворов, обеспечение устойчивости биосинтеза к контаминации. Обоснована рациональность использования традиционных молочнокислых бактерий (*p. Lactobacillus*) с природным геномом по причине большей стабильности процесса, возможности реализации непрерывной ферментации без потери целевой физиологической и биосинтетической активностей.

Высокоплотностное культивирование с дробной подпиткой для получения кормовых продуктов, позволяющее обеспечить высокую производительность биореактора, снизить объемы сточных вод и затраты на концентрирование продукта, исследовалось на дрожжах (*p. Candida*). Было отмечено, что ограничениями метода высокоплотностного культивирования являются постепенное накопление внеклеточных метаболитов, ингибирующих процессы роста и биосинтеза, а также более высокие требования к качеству используемых субстратов и к обеспечению массообмена по кислороду.

Анализ этанольного брожения дрожжами (*p. Saccharomyces*) был проведен для обоснования гипотезы о целесообразности использования H_2O_2 не только как бактерицидного средства, но и агента, регулирующего физиологическое состояние клеток дрожжей при культивировании дрожжей-сахаромицетов с целью получения качественного посевного материала с минимальным содержанием посторонней микрофлоры.

Для исследования процесса получения ценных веществ кормового, лечебно-профилактического и технического назначения были выбраны галобактерии (*Halobacterium salinarum*). Рассмотрены основные сферы их применения, особенности культивирования, пути совершенствования ферментационного процесса с целью повышения уровня накопления и выхода, использования адсорбента при организации культивирования.

Рекомбинантные штаммы (*Bacillus subtilis*) были выбраны в качестве продуцентов рибофлавина и трансформантов по рибофлавиновому оперону. Принимая во внимание, что рибофлавин проявляет фотосенсибилизирующие свойства, обладает антиоксидантной и прооксидантной активностью, была выдвинута гипотеза о возможной эффективности оксидативного воздействия как в отношении рекомбинантных штаммов, так и в отношении сверхсинтеза рибофлавина.

В процессах биологической очистки сточных вод использовались модельные и реальные стоки. Особое внимание было уделено способам очистки с внесением в

очищаемую среду пероксида водорода, как агента, играющего важную роль в самоочищении природных водных сред, в регуляции физиологического состояния микробных популяций, а также комбинированному, сочетанному воздействию H_2O_2 и видимого света.

В четвертой главе описаны условия и оборудование для проведения экспериментов. Для проведения исследований были использованы адекватные, современные материалы и методы анализа, что позволило эффективно решать поставленные задачи.

В пятой и шестой главах представлены результаты экспериментальных исследований, их интерпретация и анализ. Экспериментально установлены диапазоны доз стрессоров (H_2O_2 и других АФК) и антистрессоров, условия для достижения наибольшего положительного эффекта, при которых наблюдаемые физиологические изменения в популяциях микроорганизмов улучшают технико-экономические и экологические показатели процессов биосинтеза и биодеструкции.

Получены результаты, позволяющие утверждать, что в условиях совмещенных процессов и селективного оптимального оксидативного стрессового воздействия в ходе ферментации:

при культивировании молочнокислых бактерий (*Lactobacillus paracasei* B-4079) достижимо повышение производительности биореакторов до 10 раз с достижением продуктивности до 50 г/л·ч в мембранном биореакторе (в отъемно-доливном режиме) при содержании молочной кислоты 100 г/л, степени конверсии глюкозы в молочную кислоту 95–97%, повышении выхода молочной кислоты из углеводного субстрата на 2–5%, снижении расхода ростовых факторов в 2–3 раза, снижении содержания примесей в фильтрате культуральной жидкости и в получаемом полупродукте на стадии выделения молочной кислоты, безостановочным ведении процесса в течение несколько недель без отвода накапливаемой избыточной биомассы, упрощении поддержания асептических условий и доминированием культуры в мембранном биореакторе, снижении количества образуемой избыточной биомассы до величин не более 4,5 г/кг молочной кислоты, что ниже в 10 раз по сравнению с традиционным методом периодического культивирования при полном отсутствии гипса как отхода;

при культивировании дрожжей (*Candida tropicalis*) возможно получение биомассы кормовых дрожжей в режиме высокоплотностного культивирования с подпиткой субстратом с содержанием биомассы до 160 г/л (по асд) с повышением продуктивности биореактора по биомассе дрожжей с 2,5–3 г асд/л·ч – в периодическом без подпитки субстратом или в непрерывном хемостатном режиме и до 4–7 г асд/л·ч – в высокоплотностном режиме с подпиткой субстратом, повышение выхода биомассы от субстрата на 5–15 %, содержанием белка в биомассе на 7–10 %, устойчивости к высоким концентрациям субстратов и другим

стресс-факторам без появления признаков ингибирования роста и физиологической активности продуктами метаболизма с одновременным снижением содержания остаточных концентраций субстратов и внеклеточных продуктов метаболизма, обеспечением 30–50 %-ой экономии питательных солей, снижением количества сточных вод и концентрации остаточных загрязнений в них в 5–10 раз, без необходимости в энергоемких стадиях сгущения биомассы, что позволяет снизить суммарные затраты на сырье и энергию на 15–20 %;

при культивировании дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) возможно повышение жизнеспособности клеток в процессе спиртового брожения до 95–99 % и их бродильной активности на 10–40 %, выхода этанола на 2–5 %, при одновременном сокращении времени брожения в периодических условиях на 30 %, повышении устойчивости дрожжей к закислению среды, более длительном сохранении физиологической активности клеток и продуктивности биореактора, снижении общей обсемененности и содержания остаточных субстратов и примесей в сброженном сусле в 1,5–3 раза и совокупных эксплуатационных затрат на 5–20%;

при культивировании галобактерий (*Halobacterium salinarum*) возможно резкое повышение производительности биореакторов по биомассе и синтезу бактериородопсина (БР) при проведении процесса по варианту адсорбционной культуры с подпиткой субстратом с минимальным содержанием каротиноидов, что позволяет за один цикл повысить: уровень накопления биомассы в среде культивирования с 4–4,5 г/л (по асб) с суммарным содержанием БР 70–75 мг/л за 6–7 сут. для обычной периодической ферментации до 30–50 г/л биомассы и 1700–1750 мг/л БР за 8 сут. ферментации, с удельным содержанием БР в биомассе 2–4 %, что значительно упрощает технологию выделения бактериородопсина, а также в несколько раз снижает объем высокоминерализованных жидких стоков, затраты на выделение БР в составе пурпурных мембран и его стоимость от нескольких десятков до нескольких сотен раз (до 1 руб./мг БР) при обеспечении высокого качества получаемых образцов пурпурных мембран;

при культивировании рекомбинантных штаммов (*Bacillus subtilis*) возможно повышение устойчивости биосинтетической активности рекомбинантных штаммов за счет снижения скорости реверсии к прототрофным вариантам из-за прооксидантного действия компонентов среды культивирования, в частности, рибофлавина.

Представлены результаты экспериментальных исследований, обосновывающие гипотезу, что положительный эффект совместного действия стресс- и антистресс-факторов в отношении биологической очистки сточных вод проявляется при использовании различных активных форм кислорода (H_2O_2 , анолит электрохимического разложения раствора $NaHCO_3$ и др.), при различных способах очистки, нагрузках, содержании загрязнений (ХПК, биогенных

элементов) в исходной воде, температурах, режимах внесения H_2O_2 , с флокулами и гранулами активного ила, биопленками.

Установлено, что проведение биологической очистки в условиях селективного и оптимального оксидативного стрессового воздействия активными формами кислорода позволяет:

перерабатывать высококонцентрированные токсичные стоки, в частности фенолсодержащие, в режиме интенсивного культивирования с подпиткой субстратом (суммарно до 100 г/л и более по фенолу), лимитируемого только массообменными возможностями биореакторов, с полной минерализацией органического вещества без накопления продуктов, ингибирующих биологическое разложение, с минимальным образованием избыточного активного ила, вторичных сточных вод и остаточных загрязнений;

при типичной нагрузке по ХПК_{вх.} 500–2000 мг/л.сут. снижать ХПК_{вых.} в процессах одностадийной аэробной биологической очистки сточных вод в аэротенках проточного типа с вторичным отстойником до величин, близких к нулю, с одновременным повышением степени удаления соединений азота и фосфора;

повышать скорость образования и стабильность биопленок и гранул активного ила в аэробных условиях и отъемно-доливных реакторах, эффективность удаления органических загрязнений и биогенных элементов в отъемно-доливных реакторах;

поддерживать агрегатное состояние и морфологию активного ила, снижающих кольматацию мембран в системах биологической очистки на основе мембранных биореакторов (система «искусственная пероксисома»), что важно для стабильности работы мембранного биореактора;

реализовать процесс с оптимальным оксидативным стрессовым воздействием с улучшением показателей аэробной биологической очистки по ХПК_{вых.} в 1,5–3 раза на действующих сооружениях с активным илом, биопленкой, гранулами ила без их существенной модернизации, при этом в наиболее экономичном варианте при фактическом отсутствии капитальных затрат дополнительные суммарные эксплуатационные затраты на очистку сточных вод составят не более 20–30 % от затрат на аэрацию. При одном и том же качестве очистки – повысить нагрузку и окислительную мощность сооружений в 1,1–2 раза, снизить площади, занимаемые новыми вводимыми в эксплуатацию очистными сооружениями, а также совокупные эксплуатационные и капитальные затраты на 10–15 %.

В приложениях приведены материалы, подтверждающие практическое внедрение результатов работы.

Новизна проведенных исследований

Результаты работы, проведенной по теме диссертации, имеют несомненную фундаментальную и научно-практическую ценность, так как внесли значительный

вклад в системное рассмотрение методов микробиологического культивирования, переработки отходов и очистки сточных вод с совмещением по месту и времени микробиологических и абиотических процессов и продемонстрировали их перспективность для создания более экологически эффективных, малоотходных, высокопроизводительных, экономичных биотехнологий.

Доказана эффективность управления ростом гетеротрофных микроорганизмов, находящихся в состоянии стресса (изначально не чувствительных в обычных условиях без воздействия активных форм кислорода к освещению) посредством комбинированного воздействия активных форм кислорода (H_2O_2 , анолита электрохимического разложения, ультрафиолета А или В диапазонов спектра) и видимого света.

Впервые показано, что контролирование и использование факторов оксидативного стресса и антистрессорных, протекторных факторов в определенных условиях улучшает ростовые и биосинтетические характеристики культивируемых микроорганизмов, проведена интерпретация наблюдаемых положительных эффектов на биохимическом и генетическом уровнях.

Предложен способ реализации микробиологического процесса «контролируемый оксидативный стресс», учитывающий важную роль совместного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов в регулировании жизнедеятельности и жизнеспособности микробных клеток. Обоснована целесообразность контролирования низкоэнергетических, низкоинтенсивных воздействий на клетки микроорганизмов, находящихся в состоянии стресса.

Научно-практическая значимость

Результаты исследований могут быть эффективно использованы при проектировании новых и модернизации действующих систем микробиологического синтеза, переработки отходов, высококонцентрированных токсичных стоков и глубокой биологической очистки сточных вод.

Предложены и запатентованы способы совершенствования биотехнологических процессов, не имеющие отечественных и мировых аналогов: патенты РФ № 2188164, № 2209186, № 2268924, № 2268924, № 2323226, № 2323251, № 2394098, № 2586155, № 2712703.

Предложенные подходы выполнялись в сотрудничестве и апробировались на базе профильных организаций и предприятий: «Энви́ро-Хеми ГмбХ» (Германия), ОАО «Пивоваренная компания «Балтика», Вороновский завод по производству солода (Моск. обл.), Серебряно-Прудский биохимический завод (Моск. обл.), АО «Северсталь»; ФГУП НПО «Астрофизика», университет Тон Дзи (г. Шанхай, КНР), ГосНИИсинтезбелок, ФГУП ГосНИИгенетика, ИМГ РАН, НПФ ТЭКО, ООО «ТДС».

Учебные пособия, написанные по материалам диссертации, широко используются в учебном процессе вузов РФ, ведущих подготовку бакалавров и магистров по направлению 19.00.00 - "Биотехнология".

Замечания по работе имеют не столько критический, сколько дискуссионный характер:

1. Не совсем понятно, можно ли для разных видов микроорганизмов сформировать общий алгоритм, позволяющий установить тип и дозы стрессоров и антистрессоров в зависимости от их места в классификации и особенностей метаболизма. Как стресс влияет на старение микроорганизмов, требуется ли более частая их замена?
2. Что изменяется в метаболизме клеток дрожжей *S. cerevisiae*, при воздействии контролируемого оксидативного стресса, почему клетки становятся устойчивыми к более низкому уровню pH? Почему обработка дрожжей малыми дозами пероксида водорода и видимого света низкой интенсивности снижает время приготовления маточной культуры в 2-3 раза, ведь существует необходимость длительного пассирования клеток? Существует ли предположение о том, как фоточувствительные процессы (фоторепарация) могут принимать участие в ответе на тепловой шок?
3. С чем связан тот факт, что молочнокислые бактерии, адаптированные к действию малых доз пероксида водорода и видимого света, меньше образуют побочных продуктов жизнедеятельности?
4. По мере протекания процесса биоокисления фенола дрожжевым консорциумом, адаптированным к пероксиду водорода, наблюдалось последовательное изменение окраски среды. Наблюдалось ли такое изменение окраски среды при использовании неадаптированных микроорганизмов? Есть ли предположение о том, какие конкретно процессы полимеризации там осуществляются? Как влияет повышенная каталазная активность адаптированных микроорганизмов на этот процесс?
5. Чем можно объяснить тот факт, что разложение фенола микроорганизмами, адаптированными к оксидативному стрессу, происходит без накопления продуктов, ингибирующих биологическое разложение?
6. Важную роль при реализации предложенного подхода играет освещение. Из материалов диссертации не совсем понятно, как можно в промышленных условиях обеспечить нахождение микроорганизмов в зоне с оптимальной освещенностью в течение времени близкому к оптимальному, на сколько будет снижаться эффективность разработанных технологий при масштабировании процессов от лабораторного до промышленных объемов?
7. Несмотря на обилие экспериментальных данных, в работе не представлено математических моделей, описывающих рассматриваемые процессы, а их наличие позволило бы ускорить поиск оптимальных режимов при внедрении разработанных технологий.

Общая характеристика диссертационной работы

Указанные замечания не снижают общей высокой оценки работы. Диссертация обладает внутренним единством и является законченной научно-квалификационной работой, имеющей существенную научную новизну и практическую ценность в области промышленной биотехнологии. В работе системно изучено и показано, что совмещение по месту и времени абиотических и биотических процессов трансформации веществ в единой экологической нише, стрессорных и антистрессорных факторов с использованием направленных адаптационных изменений в популяциях микроорганизмов позволяет существенно расширить возможности управляемого культивирования микроорганизмов и улучшить технологические, экологические и экономические показатели биосинтеза и биодеструкции органических веществ.

Выдвинуто предположение, что обнаруженная возможность определенного положительного совместного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов на микроорганизмы, на показатели биосинтеза с высокой долей вероятности обусловлена адаптивной эволюцией и внутривидовыми изменениями, изменением внутриклеточного метаболизма под действием факторов оксидативного стресса, регуляторными функциями низких концентраций пероксида водорода и других АФК, индукцией фоточувствительных систем ответа на оксидативный стресс.

Научно обоснованы пути совершенствования микробиологических систем культивирования и биологической очистки с использованием совмещенных процессов и гибридных биореакторов: высокоплотного культивирования, мембранного биореактора, адсорбционной культуры, воздействия пероксида водорода и видимого света, мягкого ультрафиолета и видимого света, средств, которые подавляют абиотические реакции, протекающие в ходе ферментации, и тем самым устраняют неблагоприятное воздействие продуктов фотохимических и химических реакций на клетки микроорганизмов или, напротив, индуцируют у микроорганизмов системы ответа на оксидативный стресс.

Разработан разовый технологический регламент и базовая схема технологического процесса на получение L-молочной кислоты полимерного качества на опытной установке, мощностью 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе. Проведены опытно-промышленные испытания на сооружениях биологической очистки хозяйственно-бытовых стоков, подтвердившие эффективность технологии с оптимальным оксидативным стрессовым воздействием с достижением ХПК и содержания взвешенных веществ на выходе из очистных сооружений, близких к нулю, а также поддержанием высокой эффективности нитрификации в режиме с полным возвратом ила.

Автореферат корректно отражает содержание диссертации. По материалам диссертации опубликовано более 110 работ (в том числе 19 - в журналах, индексируемых базами данных *ISI Web of Science* и *Scopus*, более 15 в научных периодических изданиях из перечня ВАК, 3 учебных пособия), получено 9 авторских свидетельств и патентов РФ на изобретения. Положения диссертации неоднократно доложены на международных и всероссийских научно-технических конференциях и семинарах.

Заключение

Диссертационная работа представляет собой законченное исследование, вносящее значительный вклад в системное рассмотрение методов микробиологического культивирования, переработки отходов и очистки сточных вод. По своей научной и практической значимости работа соответствует паспорту специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)», требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор **Кузнецов Александр Евгеньевич** заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет», доктор технических наук (05.17.08, 05.13.01), профессор



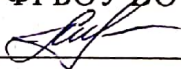
Д.С. Дворецкий

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный технический университет»
392000, г. Тамбов, ул. Ленинградская, 1
Тел. 8 (4752) 639442, 637815
E-mail: dvoretzkiy@tambov.ru

Подпись удостоверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «ТГТУ»

к.т.н. _____



Г.В. Мозгова

03.03.2021

