

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Калёнова Сергея Владимировича «Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред», представленную на соискание учёной степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Представленная диссертация составлена по традиционной схеме и изложена на 588 страницах текста, включает введение, обширный обзор литературы, методическую часть и главу экспериментальной работы, состоящую из семи разделов, выводы, список литературы и 6 приложений. Библиография состоит из 1309 наименований, содержит, в основном, современные иностранные источники.

Актуальность темы. В настоящее время экстремофильные микроорганизмы рассматриваются как возможные претенденты для улучшения показателей традиционных биотехнологических процессов, а также для разработки новых технологий получения практически значимых и, в некоторых случаях, уникальных метаболитов этих микроорганизмов. Экстремально галофильные и галотолерантные микроорганизмы, рассматриваемые в диссертации, представляют особый интерес для биотехнологических производств из-за особенностей метаболизма и возможной повышенной устойчивости к набору факторов, таких как температурный стресс, высушивание и регидратация, нестабильность в обеспечении питательными веществами, интенсивное облучение и др. Поиск микробных продуцентов в нишах с высокой соленостью, изучение их физиологических реакций в составе микробных сообществ может дать импульс развитию новых природоподобных технологий.

Потенциал использования экстремальных галофилов виден на примере галоархей р. *Halobacterium*. Биологически активные вещества этих микроорганизмов находят разнообразное применение – от фармацевтики, здравоохранения, сельского хозяйства до электроники и альтернативной

энергетики. Биомасса галоархей может использоваться в качестве биологически активной добавки с антиоксидантными и радиопротекторными свойствами, как фитостимулятор и стимулятор роста в животноводстве. Медицинское применение – и это сейчас передовой край исследований – могут найти ферменты, и липидные комплексы, так называемые, археасомы, являющиеся перспективными средствами доставки лекарств. Пурпурные мембраны галоархей, в которые входит белок фотосистемы бактериородопсин – перспективный материал, который может стать основой биомолекулярных устройств: систем хранения информации, оптических переключателей, сверхбыстрых детекторов света, голографических интерферометров.

В мировой практике в принципе, не реализован комплексный подход к подобным экстремальным галофилам с точки зрения промышленного использования и биотехнологического потенциала этих уникальных микроорганизмов.

Решению **актуальной задачи** выявления закономерностей изменения биосинтетических и физиологических характеристик экстремально галофильных микроорганизмов посвящена диссертационная работа Калёнова С. В., цель которой состояла в разработке промышленной малоотходной технологии культивирования экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum*, включающей высокоавтоматизированное регулирование биосинтеза целевых продуктов и оптимизацию сохранения получаемой биомассы, а также в использовании потенциала экстремально галофильных сообществ для реализации природоподобной технологии биокальцинирования.

Оценка содержания диссертации и автореферата. Проведенный автором аналитический обзор литературы показывает его научную зрелость, хороший кругозор и глубокое знание предмета исследований. Проанализирован большой объем публикаций, охватывающих биохимическую, микробиологическую и технологическую стороны разрабатываемой проблемы. Материал обзора представляет собственный научный интерес, т.к. показывает

перспективы использования галофильных микроорганизмов в биотехнологии на основе взаимосвязанного анализа физиологических, молекулярно-биологических и биохимических особенностей.

Раздел материалы и методы оставляет хорошее впечатление, своей методической проработанностью и использованием автором современных методик анализа при микробиологических, химических и технологических исследованиях.

Основной научный интерес представляют экспериментальные результаты диссертанта по всем исследованным процессам и направлениям исследований. Необходимо отметить, намеченную на конкретную цель постановку опытов, их достоверность и качество многочисленных экспериментов, выполненных на протяжении всей работы.

Диссертация написана грамотно в хорошем научном стиле с использованием современной терминологии, результаты исследований подробно проиллюстрированы. Собственные результаты автора детально обсуждаются в сравнении с литературными источниками, на основании проведенных обсуждений делаются обоснованные выводы, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Научная новизна. Экстремально галофильные микроорганизмы являются требовательными и по компонентам питания и по условиям проведения процессов их культивирования. Основные данные по их микробиологии и особенностям питательных сред получены достаточно давно, ориентированы на лабораторное применение и требуют обновления на новом витке исследований, посвященных прикладному применению. Автором диссертации на примере модельных экстремальных галофильных микроорганизмов получен ряд производственно-значимых и перспективных результатов.

В процессе оптимизации синтетической питательной среды для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* было показано стрессирующее действие продуктов окисления/фотоокисления ароматических кислот на показатели биосинтеза штаммов-продуцентов. Показано, что антиоксидантные свойства, химическая/фотохимическая трансформация компонентов питательной среды и метаболитов клеток *Hbt. salinarum*, а также режимы освещения растущей культуры находятся в тесной взаимосвязи и определяют биосинтетическую активность продуцентов при высокоплотном культивировании. На основании исследования этих связей впервые предложен алгоритм управления режимами высокоплотного культивирования *Hbt. salinarum*, обеспечивающий заданную направленность биосинтетических активностей клеток этих галоархей. Для культур экстремальных галоархей показана возможность высокоплотного культивирования с удалением из ростовой среды или предотвращением образования ингибиторов биосинтеза целевых биологически активных соединений. Для разных штаммов *Hbt. salinarum* показана возможность синтеза бактериородопсина или каротиноидов в высокоплотном режиме.

Впервые для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* использованы ферментолитаты зерновых как источники наиболее эффективного в данном случае аминокислотного питания и ростовых факторов.

Оптимизирован процесс распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum*, исследовано длительное хранение высушенной биомассы, изучен характер сопутствующих повреждений клеток экстремально галофильных архей.

Доказано, что при нестерильном культивировании экстремально галофильных архей и высокогалотолерантных бактерий возможна контаминация и быстрое замещение исходных культур микроорганизмов-продуцентов, особенно в режиме непрерывного культивирования. Впервые показана возможность развития негалотолерантных бактерий рода *Bacillus* совместно с экстремально галофильными археями или высокогалотолерантными бактериями

в условиях экстремально высокой солености среды. Показаны условия, обеспечивающие возможность индукции галовирусов непосредственно в ходе культивирования экстремально галофильных архей. Полученные данные позволяют точнее оценивать перспективы и методические подходы к расширению практического использования нестерильного культивирования экстремальных галофилов.

Из микробных сообществ гиперсоленых сред выделены в чистом виде бактериальные культуры, обладающие высокой уреазной активностью и способностью к биокальцинированию.

Таким образом, **важным научным вкладом** диссертанта являются предложенные новые способы интенсификации процессов культивирования экстремально галофильных микроорганизмов, основанные на оригинальных подходах, которые в промышленных условиях позволяют существенно увеличить производительность технологических процессов. Предложенные подходы актуальны и вносят значительный вклад в направлении более широкого использования галофильных микроорганизмов как промышленных биотехнологических культур.

В диссертации получен ряд несомненно **полезных в практическом плане результатов**:

– разработаны новые синтетические среды для культивирования промышленных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*, предложен состав комплексной питательной среды для экстремальных галофильных продуцентов каротиноидов и бактериородопсина;

– получены новые высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum*, которые депонированы в официальных Коллекциях микроорганизмов;

– оптимизированы условия, обеспечивающие высокую эффективность процесса культивирования галоархей *Hbt. salinarum*, включающие способ подготовки посевного материала, внесение антиоксидантов, режимы и

спектральные характеристики освещения культур, непрерывные и высокоплотностные режимы культивирования штаммов-продуцентов промышленного уровня;

– создан высокоавтоматизированный комплекс для культивирования галофильных микроорганизмов, разработан опытно-промышленный регламент эксплуатации этого комплекса и программное обеспечение “BioDrome 3.0” для управления биосинтетическими процессами, в которое интегрирована экспресс-методика определения содержания бактериородопсина;

– разработаны новые составы питательных сред для культивирования промышленных штаммов галоархей *Hbt. salinarum* на основе ферментоллизатов зерновых, полностью обеспечивающие потребности клеток в питании и ростовых факторах;

– определены режимы распылительной сушки биомассы галоархей *Hbt. salinarum* обеспечивающие оптимальные условия сохранения целостности компонентов клеток;

– определены подходы, снижающие вероятность контаминации при культивировании экстремальных галофилов;

– разработан опытно-промышленный регламент производства биомассы экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum* и фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина;

– предложено использовать продукты лизиса галоархей *Hbt. salinarum* для создания новых медицинских препаратов комплексного действия. Стабилизированный (иммобилизованный) лизат клеток галоархей *Hbt. salinarum* может использоваться в ветеринарии и косметологии;

– разработан лабораторный технологический регламент производства иммобилизованной формы биопрепарата, обладающего высокой биокальцинирующей активностью и устойчивостью к щелочной среде для

использования в качестве технической добавки, улучшающей функциональные и защитные характеристики бетона.

Автоматизированный комплекс для культивирования микроорганизмов и разработанное программное обеспечение “BioDrome 3.0” и его элементы используется в научных исследованиях, а также в учебном процессе в РХТУ им. Д.И. Менделеева на кафедре биотехнологии и кафедре процессов и аппаратов химической технологии. Ранние версии программного обеспечения “BioDrome” использовались в научных исследованиях на стендах ГУП НПО “Астрофизика”, ВНИИ Молочной промышленности. Разработаны новые способы культивирования микроорганизмов и получены штаммы-продуценты, защищенные патентами Российской Федерации.

Личный вклад автора состоит в постановке задач исследований, планировании и собственноручном проведении большей доли экспериментов и культивирований галофилов, в обработке и интерпретации результатов, в анализе литературных источников, написании монографий, учебных пособий, статей, патентов, технической документации.

Обоснованность и достоверность результатов. Используемые в работе современные методы исследований обеспечивают надежность и достоверность полученных результатов. Экспериментальная часть работы выполнена обстоятельно и хорошо изложена. В целом, работа представляется очень добротной и оставляет хорошее впечатление.

Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на российских и международных научных конференциях и конгрессах, а также отражены в отчетах по НИР, грантам, государственным контрактам.

Публикации автора отражают содержание и результаты исследования. Основные научные результаты диссертации опубликованы в 42 работах, из них 19 в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ, в том числе 13 публикаций в журналах, индексируемых в международных информационно-

аналитических системах научного цитирования (Web of Science и Scopus), получены 3 патента на изобретение РФ, 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ; подготовлены 2 монографии и 2 учебных пособия.

К диссертационной работе необходимо указать на ряд замечаний и пожеланий:

– В работе присутствуют достаточно общие положения об интересе косметических и фармацевтических фирм к продуктам на основе экстремальных галофилов, а также говорится о препаратах на основе галоархей для человека и животных. Существуют ли данные о клинических испытаниях таких препаратов и их практическом применении?

– Необходимо было обозначить в заключении диссертации роль и важность полученных результатов в сравнении с проводящимися в мире исследованиями и имеющимися разработками в области экстремально галофильных микроорганизмов.

– Если автор говорит о малоотходной технологии, то необходимо было указать долю отходов и их характеристики в п. 3.5 диссертации и возможности по регенерации культуральной жидкости и адсорбента.

– В тексте диссертационной работы присутствуют мелкие опечатки и некоторые несогласованности в тексте.

Однако, высказанные замечания не снижают научной ценности и, безусловно, положительного впечатления от выполненного актуального и практически значимого исследования.

Заключение. Диссертационная работа является комплексным завершённым исследованием, которое отвечает поставленным задачам и представляет собой совокупность научно-технических достижений, которые вносят существенный вклад в биотехнологию экстремальных галофилов.

По своей научной и практической значимости диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), требованиям пп. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции 01.10.2018), а соискатель Калёнов Сергей Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Доктор технических наук, профессор кафедры

«Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза»

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

26.04.2021.



Борисенко Евгений Георгиевич

125080, г. Москва, Волоколамское ш., 11

+7(499)750-01-11

email: biotech@mgupp.ru

Подпись Борисенко Евгения Георгиевича заверяю:

Ученый секретарь, к.т.н., доц.



Ж.В. Новикова