

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук, профессора, заведующего кафедрой биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского»

Конновой Светланы Анатольевны на диссертационную работу Калёнова Сергея Владимировича «Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсолёных сред», представленную на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы

Широко распространенные гиперсолёные среды являются экологическими нишами для большого разнообразия галофильных и галотолерантных организмов, адаптированных к существованию в экстремальных условиях. Наиболее разнообразны заселяющие эти ниши микроорганизмы, которые относят к экстремо- или даже полиэкстремофильным. В ходе адаптации к условиям среды эти микроорганизмы способны производить разнообразные метаболиты, вызывающие большой интерес ученых как теоретиков, так и практиков, в связи с расширением сфер их применения. Перечень продуцируемых экстремофильными микроорганизмами веществ, востребованных в разных сферах деятельности человека, включает такие продукты как каротиноиды, ферменты, экзополисахариды, гликопротеины, полиаминокислоты, полиалканоаты, галоцины, полярные фосфолипиды и археосомы галоархей и др. Изучение свойств и физиологической активности этих микроорганизмов при их функционировании в экстремальных условиях и в составе сложных сообществ галофилов может стать основой для создания новых биопрепаратов и совершенствования технологий их получения. Однако, физиология клеток галофильных микроорганизмов является недостаточно изученной, что не позволяет раскрыть их биотехнологический потенциал, в особенности при промышленном культивировании. Особое место среди галофильных микроорганизмов занимают галоархеи, биоактивные компоненты которых находят широкое применение. Массовое внедрение в производство продуктов на основе галофилов сдерживается спецификой процессов их культивирования, что связано как с нестабильностью самих продуцентов, так и традиционными подходами к

культивированию, которые дают небольшой выход биомассы и целевых продуктов. В связи с этим исследование Каленова С.В. направлено на реализацию актуальной темы – создание промышленной малоотходной технологии культивирования экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum*, с использованием потенциала других экстремально галофильных микроорганизмов для реализации природоподобной технологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке ряда грантов, научных программ, контрактов, в том числе грантов РФФИ, Госзадания Минобрнауки, НИР в рамках различных целевых программ, что также свидетельствует о значимости выбранной темы для науки и практики.

Обоснованность научных положений, рекомендаций и достоверность результатов исследований подтверждается корректностью применения статистических методов. Статистическая значимость полиномиальных моделей оценивалась с помощью F-теста, а значимость коэффициентов регрессии проверялась с помощью t-тестов. Программное обеспечение STATISTICA 12 (StatSoft, Россия) использовалась для планирования и анализа экспериментов.

Исследования выполнены с использованием современных высокоточных методов анализа, стандартных методик и приемов, адекватных поставленным задачам исследования, в частности, автором применялись методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, фотон-корреляционной спектроскопии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии, разнообразные методы биотехнологии, молекулярной биологии, биофизики и биохимии.

Результаты исследований прошли убедительную апробацию на 25 международных и пяти всероссийских конференциях. Полученные в ходе диссертационных исследований данные достаточно полно представлены в 42 опубликованных 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) в таких как: *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *Advances in Biotechnology*, *Биотехнология*, *Scientific reports*, *Journal of Biotechnology*. По результатам исследований опубликованы также 2 монографии.

Научная новизна исследований, результатов и выводов

Выполнена оптимизация питательной среды и впервые предложен алгоритм управления режимами высокоплотного культивирования *Hbt. salinarum*, обеспечивающий накопление биомассы, а также активность биосинтеза каротиноидов и бактериородопсина. Выявлена роль химической/фотохимической трансформации компонентов питательной среды в биосинтетической активации штаммов-продуцентов. Также отработаны режимы распылительной сушки биомассы, выявлен характер сопутствующих повреждений клеток и длительность сохранности высушенной биомассы галобактерий.

Впервые показана возможность использования продуктов ферментативного гидролиза зерновых как источника аминокислот и факторов роста для галобактерий.

Впервые выявлено развитие неустойчивых к высоким концентрациям соли бацилл совместно с экстремально галофильными археями или бактериями в условиях высокой солености среды. Показана возможность индукции галовирусов непосредственно в ходе культивирования экстремально галофильных архей.

Выявлена высокая уреазная активность и способность к биокальционированию у бактериальных культур из микробных сообществ гиперсолёных сред.

Получены новые высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum*: несколько штаммов-продуцентов фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина, отличающиеся сниженным уровнем спонтанных мутаций; штамм-продуцент C₅₀-каротиноидов, обладающий повышенной устойчивостью к поражению галовирусами. Новые культуры депонированы в официальных Коллекциях микроорганизмов (Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НБЦ ВКПМ и коллекции уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения UNIQEM).

Научная новизна исследований также подтверждается 3 патентами РФ на изобретение, свидетельством о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Научно-практическая значимость результатов исследования

Оптимизированы условия получения биомассы и продукции биологически активных метаболитов в режиме высокоплотного культивирования *Hbt.*

salinarum. Разработан лабораторный технологический регламент производства иммобилизованной формы биопрепарата на основе культуры бактерий *Lysinibacillus macroides* из микробного сообщества гиперсоленого озера, улучшающего функциональные и защитные характеристики бетона.

Автором диссертационного исследования показаны и решены основные проблемы на пути реализации масштабных промышленных биотехнологических процессов с использованием экстремальных галофилов, предложены новые подходы и методики для стабилизации процессов культивирования и сохранения получаемой биомассы. Получены новые и критически важные для промышленного биотехнологического производства данные о сопутствующих экстремальным галофилам микроорганизмах и галовирусах.

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 ПО “BioDrome” использовались в научных исследованиях на стендах ГУП НПО “Астрофизика”, ВНИИ Молочной промышленности. Разработаны новые способы культивирования микроорганизмов, защищенные патентами РФ.

По результатам исследования изданы два учебно – методических пособия: «Дистанционная подготовка биотехнологов: элементы виртуальной образовательной среды. М.: ДМК Пресс, 2014. 94 с.» ; «Проектирование биотехнологических производств. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2019. 230 с.», которые используются в учебном процессе для студентов, бакалавров и магистрантов РХТУ им. Д.И. Менделеева и других вузов.

Структура и объем диссертации

Структура диссертации традиционна и включает введение, заключение, выводы и главы: обзор литературы, материалы и методы и результаты исследований с их обсуждением. Работа содержит 6 приложений. Список используемых литературных источников включает 1309 наименований. Текст диссертации изложен на 588 страницах, иллюстрирован 67 рисунками и 22 таблицами.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулирована цель и задачи работы, представлены данные о научной новизне и практической значимости работы, сведения о публикациях и апробации диссертационных исследований.

В первой главе - обзоре, состоящем из девяти разделов и изложенном на 228 страницах текста, обобщены литературные данные, характеризующие гиперсоленые среды и их микробоценозы. Представлены характеристики галофильных микроорганизмов - экстремофилов и полиэкстремофилов, анализ исследований по таксономии и классификации этих микроорганизмов, охарактеризованы отдельные таксономические группы последних, и экосистемы гиперсоленых сред. В обзоре описаны механизмы адаптации микроорганизмов к существованию в условиях осмотического стресса, охарактеризованы морфо-физиологические особенности строения клеточных стенок галофильных микроорганизмов, транспорт неорганических ионов и органических молекул, системы фотореактивации и защиты от активных форм кислорода. Отдельный раздел посвящен существующим механизмам репарации ДНК, световой и темновой, а также анализу особенностей строения генома галоархей и других соединений галофильных микроорганизмов. Ряд разделов посвящены метаболизму галофильных микроорганизмов и их биотехнологическому потенциалу.

В главе 2 «Материалы и методы», включающей 29 разделов с подразделами и изложенной на 37 страницах, представлен широкий перечень используемых автором методов и подходов, включая методы биотехнологии, микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, статистики и др. Среди использованного оборудования и современных методов можно отметить: варианты электронной микроскопии, высокоэффективную жидкостную хроматографию, моделирование с помощью искусственных нейронных сетей, высокоавтоматизированный комплекс для культивирования, молекулярно-биологические методы, оборудование для измерения спектральных характеристик излучения, методы планирования эксперимента и статистической обработки. В тексте главы также представлены объекты исследования и некоторые их характеристики.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» состоящей из 7 разделов с подразделами, изложенной на 114 страницах, каждый раздел начинается с небольшой литературной преамбулы. Далее представлены обобщенные результаты экспериментов по

оптимизации условий культивирования галоархей по количеству биомассы, а также каротиноидов и бактериородопсина. Выявляется роль уровня аэрации среды, освещения и соотношения и качества компонентов среды на продукцию биомассы и биологически активных продуктов. Показано влияние продуктов «старения среды» на рост микроорганизмов при периодическом и непрерывном культивировании, предлагаются технологии очистки культуральной жидкости в процессе культивирования от токсических метаболитов с использованием адсорбентов на основе активированного угля, инкапсулированного в агар.

Предложено описание высокоплотностного культивирования штаммов-продуцентов каротиноидов в мембранном биореакторе а также высокоавтоматизированного комплекса для культивирования микроорганизмов (с учётом особенностей экстремальных галофилов). Представлены технико-экономические показатели производства бактериородопсина и биомассы *Hbt. salinarum* при различных вариантах исполнения.

Отдельный раздел исследований связан с получением ферментативных гидролизатов зерновых для культивирования и производства биомассы *Hbt. salinarum*.

Отработаны условия распылительной сушки биомассы галофильных архей и влияние способа сушки на сохранение жизнеспособности бактерий, а также количеств каротиноидов и бактериородопсина.

Представляют интерес и практическую значимость эксперименты по выращиванию галоархей в нестерильных условиях, отработаны рекомендации по увеличению срока ферментации без контаминации.

Последний раздел главы посвящен карбонатогенезу бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, и разработке биопрепарата на основе этих бактерий для улучшения свойств и защиты бетона.

Заключение и выводы диссертации полно и точно резюмируют основные положения работы. Автореферат и публикации автора отражают основные содержание и положения диссертационной работы.

В ходе рецензирования работы возникли некоторые **замечания** по подготовке текста диссертации:

1. Обзор для диссертации представляется избыточным и по объему, и по содержанию, так как некоторые рассматриваемые в обзоре вопросы к

существом практической части диссертации имеют только косвенное отношение.

2. Считаю, что к недостаткам представления материала в главе 2 – «Материалы и методы» относится изложение в ряде разделов обоснований выбора методов с привлечением литературных источников, и также результатов экспериментов с рисунками и таблицами, например разделы 2.4, 2.9, 2.11, 2.24. Считаю, что эти материалы нужно было бы перенести в главу 3 с соответствующим названием.

3. К недостаткам изложения материала в главе 3 можно отнести в ряде случаев декларативное представление данных, без приведения непосредственных результатов экспериментов (раздел 3.1.1.). В частности, среди рисунков 3.1 -3.3 нет результата анализа семисуточной среды, подвергавшейся освещению без посева микроорганизмов, а в таблице 3.2 по логике вещей не хватает результатов эксперимента со средой после автоклавирования.

4. В некоторых случаях имеет место использование лабораторного сленга, например, стр. 279 - «...суспензию клеток объемом 10 мл отфуговывали при 7500 об./мин. » . Стр. 281 «Полученные суспензии галобактерий ... фуговали при 7500 об./мин». Встречаются неудачные выражения стр. 274, «Часть биомассы ...растворялась в стандартном для галоархей растворе минеральных солей», встречаются невыправленные опечатки.

Указанные замечания не снижают высокой научной и практической значимости работы и носят рекомендательный характер.

Общий объем работы, высокий современный уровень методических приемов, новизна результатов, их достоверность и практическая значимость полученных данных позволяют высоко оценить диссертационную работу Калёнова Сергея Владимировича.

Заключение

Диссертационная работа Калёнова С.В. является объемной завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований фундаментального и прикладного характера сформулированы теоретические положения, которые можно квалифицировать как научное достижение, вносящее существенный вклад в изучение физиологических реакций и

биотехнологию экстремально галофильных архей; работа содержит предложения по повышению продуктивности и устойчивости их культивирования, предлагает аппаратное оформление и программное обеспечение для ведения таких процессов.

По своей научной и практической значимости, методическому уровню и научной новизне диссертационная работа Калёнова Сергея Владимировича «Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсолёных сред», представленная на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» соответствует паспорту специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), и требованиям, предъявляемым ВАК РФ к докторским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. в ред. от 01.10.2018 г. с изм. от 26.05.2020), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

Коннова Светлана Анатольевна

доктор биологических наук

03.00.04 – биохимия (биологические науки) (2003 г.)

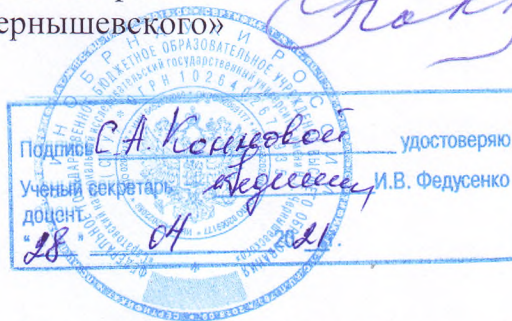
Профессор

Заведующий кафедрой биохимии и биофизики

ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского»



С.А. Коннова



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Биологический факультет

410012, ул. Астраханская д. 83, г. Саратов

Контактный телефон +79172183221

e-mail: Kinnovasa@yandex.ru