

## Отзыв официального оппонента

на диссертацию **Калёнова Сергея Владимировича**

«Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред»

на соискание учёной степени доктора технических наук

по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология)

**Актуальность темы выполненной работы.** Экстремальные природные ниши, такие как засушливые районы, горячие воды, вулканы, вечные льды и соленые озера являются источником уникальных микробиоценозов. Ведь чтобы выжить обитающие там микроорганизмы должны обладать уникальной биохимией и стрессом клеток. В соленых источниках, где помимо запредельно высоких концентраций солей, действуют перепады температур, ультрафиолет, обезвоживание-регидратация, дефицит питания, постоянно обнаруживаются сравнительно многочисленные микробные сообщества – т.н. галофильные микроорганизмы. Для своего выживания под влиянием критических для обычных бактерий факторов галофильные микроорганизмы должны обладать уникальным метаболизмом, изучение которого представляет значительный научный и практический интерес. Полученные знания могут быть использованы, например, для целенаправленного синтеза биологически активных соединений с заданными свойствами, так и для создания новых биотехнологий.

Наиболее исследованным экстремальным галофильным микроорганизмом являются галоархеи вида *Halobacterium salinarum*, биоактивные компоненты и биомасса которого стали находить различное практическое применение.

**Цель работы** состояла в разработке промышленной малоотходной технологии культивирования экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum*, с автоматическим регулированием ключевых параметров, а также в применении потенциала экстремально галофильных сообществ для создания природоподобной технологии биокальцинирования.

В диссертации поставлены наиболее значимые задачи, решение которых даст возможность достичь поставленной цели. Все они (11 задач) весьма масштабные, логически обоснованные и последовательные. Например, работа начинается с анализа сообществ экстремальных галофилов и отдельных микроорганизмов во взаимосвязи с особенностями среды их обитания, определяются пределы экстремофильности выбранных галофилов и стратегии их адаптации при изменении условий окружения. Затем изучаются особенности их метаболизма при меняющихся условиях, механизмы генетической регуляции и влияние их на выработку практически значимых соединений. Далее разрабатываются питательные среды, условия культивирования выбранного штамма архей, концентрирования и высушивания клеточной массы. И, наконец,

определяется возможность создания инновационного биопрепарата для улучшения функциональных и защитных характеристик бетонов.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Основные положения научной новизны, на наш взгляд, состоят в следующем. Это выделение из соленых источников экстремально галофильных микроорганизмов, в том числе обладающих высокой уреазной активностью и способностью к биокальцинированию, их всестороннее изучение как на клеточном, так и популяционном уровне. Это определение ключевых факторов жизнедеятельности экстремально галофильного штамма архей, от которых зависит его биосинтетическая активность и продукция практически важных метаболитов, в том числе бактериородопсина и каротиноидов. Это оптимизация *Upstream* стадии, включая разработку пилотной технологии культивирования штамма-производителя *Hbt. salinarum* с максимально возможным выходом клеточной массы и целевых соединений, а также всех *Downstream* процессов по переработке добытых биоматериалов (концентрирование, сушка и получение биопрепарата). И, что самое главное, создание научной базы для использования экстремально галофильных микроорганизмов и некоторых их симбионтов в биотехнологических процессах получения практически ценных биологически активных соединений с заданными свойствами.

### **Практическая значимость работы** весьма весомая и многогранная.

По биологической части – это получение и депонирование официальных коллекций микроорганизмов нескольких штаммов-производителей с пониженным уровнем спонтанных мутаций, устойчивостью к лизирующим бактериофагам.

По биотехнологической части – это и подбор питательных сред, и оптимизация условий аппаратного культивирования штаммов-производителей каротиноидов и бактериородопсина с разработкой как опытно-промышленного регламента, так и экспресс-методик для управления и контроля биотехнологическими процессами.

По технической части – это создание высокоавтоматизированного комплекса для культивирования галофильных микроорганизмов, разработка программного обеспечения «BioDrome 3.0» для управления этим комплексом, режимы сублимационного и распылительного высушивания биомассы галоархей. Следует отметить, что указанный комплекс 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.

Кроме того, продукты лизиса галоархей *Hbt. salinarum* автор предлагает использовать в медицине, ветеринарии и косметологии. Прежде всего, речь идет о протеазах, отличающихся высокой стабильностью, и каротиноидах, защищающих ферменты от окисления.

### **Связь работы с научными программами**

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» в рамках и при поддержке грантов, научных программ, контрактов и целого ряда плановых НИР. Например, это были гранты РФФИ 16-19-10469 и «Темпус» 2010 – 3358/001-00, госзадание Минобрнауки 4.5404.2011, НИР в рамках: ФЦП ГК № 02.740.11.0784, АВЦП 2.1.1/3817, ВЦП РНП 2.1.1.6.177, Минобрнауки РФ 2.6.2.(00.0)221.009, а также целевые НИР: 529/15.3-01-04, 506/15.3-6-02ГБ. Научный консультант – доктор биологических наук, профессор Дмитрий Анатольевич Складнев.

На защиту автор выносит положения, касающиеся разработки состава питательных сред для экстремальных галофилов, применения антиоксидантов, способов и режимов аппаратного культивирования продуцентов с использованием средств автоматизации и разработанных программ управления процессами, параметров распылительного высушивания биомассы *Hbt. salinarum*, данных по выживаемости обезвоженных клеток в процессе хранения и регидратации, технологии высокоплотностного культивирования галоархей для получения бактериородопсина и каротиноидов, а также состава биопрепарата для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона. Все выносимые на защиту положения соответствуют поставленной цели диссертации и задачам для ее достижения.

**Степень обоснованности научных положений** диссертации обеспечена глубоким анализом литературы, методически правильным соотношением целей, задач исследования и путей их реализации, достаточным количеством проведенных экспериментов, широким арсеналом современных методов исследований.

Доказуемость результатов работы основывается на значительном массиве экспериментальных, статистически обработанных данных, их согласованностью с выдвинутыми теоретическими положениями автора, а также выполнением исследований на сертифицированном и метрологически поверенном оборудовании. В этой связи достоверность и новизна полученных автором данных не вызывает сомнений.

**Ценность для науки и практики** диссертация состоит, прежде всего, в создании научно-технической базы для внедрения экстремально галофильных микроорганизмов в биотехнологические процессы по добыче ценных метаболитов – бактериородопсина, каротиноидов и др., а также производству препаратов на основе уробактерий для биокальцинирования с целью укрепления, например, бетонных конструкций, и внедрению других природоподобных технологий в различные сферы жизнедеятельности человека.

Весьма значимым результатом диссертации является и создание высокоавтоматизированного комплекса для культивирования галофильных микроорганизмов, разработка программного обеспечения «BioDrome 3.0» для управления этим комплексом.

**Новизна и приоритетность исследований** автора подтверждены тремя патентами РФ на изобретение, справками о депонировании штаммов, их генотипированием, свидетельствами о государственной регистрации программы для ЭВМ, лабораторным и опытно-промышленными регламентами на производство субстанций и биопрепарата, экспресс методиками для управления и контроля биотехнологическими процессами, а также использованием материалов диссертации в учебном процессе в РХТУ им. Д.И. Менделеева на кафедре биотехнологии и кафедре процессов и аппаратов химической технологии и пр. Представленные в приложении к диссертации документы полностью подтверждают имеющиеся разработки и решения.

#### **Публикации по теме диссертации**

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 42 работах, из них 19 в изданиях из перечня ВАК РФ, включая 13 публикаций в журналах, индексируемых в международных информационно-аналитических системах Web of Science и Scopus. По теме диссертации изданы две монографии и два учебных пособия.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из 3-х глав, включая введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты экспериментальных исследований и их обсуждение, заключение выводы и 6 приложений. Библиографический список включает 1309 источников отечественной и зарубежной научной литературы. Текст диссертации изложен на 588 страницах, иллюстрирован 67 рисунками и 22 таблицами.

#### **Оценка содержания диссертации**

Во введении излагается актуальность и степень разработанности выбранной темы, предлагаются возможные пути и методология решения проблемных вопросов, приводятся цель и задачи исследований, описываются научная новизна и практическая значимость диссертации, раскрывается связь работы с текущими научными программами, формулируются положения, выносимые на защиту. Вводная часть завершается данными по апробации результатов исследований, публикациям и структуре диссертации.

В обзоре литературы приводятся сведения о гиперсоленых озерах, обитающих там галофильных и галотолерантных микроорганизмах, их классификации, таксономии, описываются стратегии их выживания, дополнительные факторы влияния (свет, температура, давление, высушивание), конкуренция со стороны других представителей



биотопа и пр. Приводятся сведения по вирусам галоархей. Характеризуются микробные популяции крупнейших гиперсоленых экосистем нашей планеты, таких как Большое Соленое озеро в США, Мертвое море на границе Израйля и Иордании, Вади ан-Натрун в Египте, солнечные солевариц и др. Анализируется морфология, специфика строения и уникальные компоненты клеток галофилов, адаптивные механизмы их существования в экстремальных условиях среды обитания. Раскрываются особенности питания и метаболизма галоархей. На основании всестороннего анализа большого массива данных научной литературы автор приходит к заключению, что уникальные возможности галофилов к адаптации делают эти экстремофильные микроорганизмы многофункциональными «микрофабриками», способными производить широкий спектр химических соединений. Эти разнообразные вещества находят применение в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, медицине, фармакологии, полимерной, текстильной, бумажной и горнодобывающей промышленности. Наиболее известные продукты метаболизма галоархей представлены различными группами ферментов (протео-, липо-, амилитические, алкогольдегидрогеназа), бактериородопсином, каротиноидами, полимерами, экзополисахаридами. В заключительной части обзора литературы автор раскрывает подходы по внедрению экстремальных галоархей в биотехнологические процессы по добыче вышеуказанных метаболитов и проблемы, которые необходимо в первую очередь для этого решить.

Обзор литературы написан наукоемким стилем добротнo, очень обстоятельно и с большим интересом читается. По объему он занимает 39,6% диссертации.

В главе 2 «Материалы и методы» на 10 страницах описываются используемые в работе штаммы *Hbt. salinarum*, *Halomonas utahensis*, *Bacillus subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. cereus*, приводятся питательные среды для их твердофазного и глубинного культивирования, методы мутагенеза и отбора мутантов. Характеризуется основное и вспомогательное оборудование, применяемые для культивирования, выделения, концентрирования, хроматографической очистки и обезвоживания (лиофилизация и распылительное высушивание) материалов. Описываются специальные эксперименты по культивированию галоархей как продуцентов бактериородопсина с использованием разных по спектру источников излучения. Указываются методики изучения микробов и образцов приемами электронной просвечивающей и сканирующей микроскопии, измерения дзета-потенциала клеток и пр. Излагается технология получения биопрепарата для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона и условия применения такого препарата. Приводятся методы планирования и статистической обработки результатов.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» в 7 разделах, составляющей 21% объема работы, собраны все основные разработки и достижения автора. Так, в первых трех

разделах (3.1- 3.3) излагаются результаты касающиеся выбору и оптимизации питательных сред, получению и применению ферментативных гидролизатов злаков в качестве основы питательных сред, разработке способов культивирования *Hbt. salinarum*. В разделе 3.4 представлены данные по хранению биомассы производственного штамма, в разделе 3.5 – технико-экономическое обоснование производства бактериородопсина с описанием и характеристикой стадий биотехнологических процессов, в разделе 3.6 – о нестерильном культивировании галофилов. И, наконец, в разделе 3.7 излагаются достижения автора по управляемому карбонатогенезу с помощью препарата уробактерий для улучшения свойств и защиты бетона от разрушения. Разделы написаны наукоёмким стилем и понятно. Результаты исследований иллюстрированы 42 рисунками и 12 таблицами.

В заключении подводятся итоги всем теоретическим и практическим разработкам, техническим решениям и примененным инновациям автора. Так, отличная методическая подготовка позволила С.В. Калёнову исследовать многообразие обменных реакций внутри таких экстремофильных сообществ, устанавливать вырабатываемые клетками вещества-регуляторы и продукты метаболизма, сопоставлять эти данные с результатами исследований биотехнологических процессов на основе чистых монокультур. Содержание представленного заключения позволяет оценить объем выполненных работ в целом, понять необходимость, логику и смысл их проведения, а также ценность диссертации для науки и практики. От его прочтения читатель проникается убеждением, что автору действительно удалось решить проблему, касающейся внедрению практически ценной группы микроорганизмов – экстремально галофильных архей в биотехнологические процессы получения на их основе ряда полезных соединений и биопрепаратов, имеющей важное народно-хозяйственное значение.

Далее следуют «ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ» из 14 пунктов. В них, на наш взгляд, полностью отражен научно-практический потенциал диссертации, теоретическая значимость проведенного исследования, все вынесенные на защиту положения и подытожены основные результаты диссертационной работы.

Диссертация также содержит 6 приложений, включая аминокислотные профили питательных сред на основе очищенных ферментализатов, расчет концентрации каротиноидов в биомассе с использованием искусственных нейронных сетей, технологическую схему производства бактериородопсина и чертежи фотобиореактора для его производства, спецификацию комплекса культивирования, генетические последовательности использованных в работе штаммов, свидетельства их депонирования, опытно-промышленный регламент на получение бактериородопсина и биомассы галоархей, а также акты о внедрении результатов работы.

Далее приводится перечень основных публикаций по теме диссертации, включающей 19 статей в научных журналах из перечня ВАК РФ, 2 монографии, 4 патента, 2 учебных пособия, 9 статей в других изданиях и 13 тезисов конференций. Публикации освещают направление работы, их содержание и суть выполненных исследований.

Автореферат, составленный на 39 страницах машинописного текста, достаточно полно отражает содержание и основные итоги диссертации. Автореферат написан понятно, информативно и без особых замечаний. Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

#### **Замечания по диссертации**

Нет сведений о личном вкладе соискателя, совместно проведенных экспериментах.

Обзор литературы написан очень обстоятельно с подробнейшей характеристикой всех гиперсоленых озер планеты, микробных биотопов, стратегий выживания обитающих там галофильных и галотолерантных микроорганизмов, их классификации, таксономии и пр., что свидетельствует о большой компетенции и колоссальном трудолюбии автора. Вместе с тем, эта часть заняла почти 40% диссертации, а в итоге получен 588 страницный печатный труд, что нетипично даже для докторской диссертации.

В заключении к диссертации нет данных о том, насколько полученные результаты и выводы согласуются с исследованиями других авторов по данной теме.

Вместе с тем, указанные моменты в представлении диссертации не имеют принципиального характера и несколько не снижают, безусловно, высоких научно-практических достоинств выполненной работы.

**Пожелание.** Ввиду значительного научного интереса к экстремально галофильным микроорганизмам и биотехнологическому их потенциалу, будет уместным и актуальным издание соответствующей монографии, взяв за основу обзор литературы данной диссертации.

Таким образом, диссертация Сергея Владимировича Калёнова «Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред» по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) на соискание учёной степени доктора технических наук является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержатся новые научные, технические и технологические решения по внедрению практически ценной группы микроорганизмов – экстремально галофильных архей в биотехнологические процессы получения на их основе ряда полезных соединений и биопрепаратов, имеющих важное народно-хозяйственное значение. Автором с использованием комплекса современных методов были выделены



