



УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО «ВГУИТ»

д.б.н., профессор

В.Н. Попов

« 29 » апреля 2021 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (ФГБОУ ВО «ВГУИТ») на диссертацию Калёнова Сергея Владимировича «Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред», представленную на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### Актуальность темы исследования

Современная промышленная биотехнология рассматривает микроорганизмы-экстремофилы как возможные перспективные продуценты широкого спектра практически важных биологически активных веществ и новых биопрепаратов. Особое внимание в этом аспекте уделяется микроорганизмам из экстремально галофильных микробных сообществ. Особенности метаболизма экстремальных галофилов в условиях повышенного осмотического давления при максимальном уровне солености, высокой температуре и облучении, различной плотности популяции и доступности субстратов, в условиях оксидативного стресса, на фоне межвидовой конкуренции ведет к набору физиологических реакций, управление которыми может служить средством для совершенствования процессов управляемого культивирования микроорганизмов.

Экстремальные галофилы к настоящему времени используются в ряде технологических процессов. До недавнего времени внимание биотехнологов концентрировалось на получении одного из наиболее изученных из синтезируемых галоархеями продуктов – фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина. Однако не менее актуальное направление использования экстремально галофильных микроорганизмов – это расширение медицинского применения специфических биологически активных веществ на их основе, таких как каротиноиды, ферменты, гликопротеины, галоцины, полярные липиды и археосомы. Ежегодно спектр целевых галобактериальных и галоархейных метаболитов/компонентов



существенно расширяется, что отражает заинтересованность крупнейших игроков на рынке косметики и фармацевтики в препаратах на основе галофилов. При этом следует отметить, что технологии производства этих препаратов в большинстве случаев требуют существенной доработки.

Самыми известными и востребованными являются галоархеи *Halobacterium salinarum*, биоактивные компоненты и биомасса которых находят различное практическое применение в технике и медицине. Однако их биотехнологический потенциал далеко не раскрыт из-за применения стандартных, не учитывающих специфических для галофилов требований к методам промышленного культивирования, что приводит к незначительным выходам целевых продуктов биосинтеза, выпуске препаратов на основе галофилов малыми партиями.

Изучение принципов функционирования экстремофильных сообществ, метаболизма микробных сообществ экстремальных экосистем, сопутствующих и находящихся в тесном взаимодействии с экстремальными галофилами микроорганизмов актуально и перспективно для реализации в биотехнологиях, нацеленных на различные варианты практического применения, в том числе, разработке биопрепаратов для применения в новых областях, в том числе, с использованием культур, которые обладают свойствами деструкторов трудно разлагаемых токсичных соединений (пестицидов, нефти и т.п.) и активно работают в средах с широким диапазоном солености.

Исследование галофилов и галофильных микробных сообществ с целью использования уникальных биосинтетических способностей этих природных экстремофилов для реализации в биотехнологических процессах, нацеленных на различные варианты практического применения, имеет **несомненную актуальность и научную ценность.**

#### **Научная новизна исследования**

Автором представлены результаты исследований, направленных на совершенствование процесса культивирования экстремально галофильных микроорганизмов для получения продуктов биосинтеза с учетом уникальных свойств этой группы. Используя галоархеи, как модельные экстремально галофильные микроорганизмы, автором разработаны новые композиции питательных сред, показано влияние продуктов химического/фотохимического **окисления**, как самих компонентов питательной среды, так и возможных метаболитов галоархей на биосинтетическую активность разных штаммов-продуцентов бактериородопсина и каротиноидов. Используя комплексный подход при изучении факторов, способных обеспечить высокоплотностное культивирование галоархей, прежде всего – антиоксидантные свойства, химическая/фотохимическая трансформация компонентов питательной среды и метаболитов клеток *Hbt. salinarum*, а также режимы освещения растущих культур, автор установил, что перечисленные параметры взаимосвязаны и определяют итоговую биосинтетическую активность штаммов-продуцентов. На основании исследования этих связей впервые предложен алгоритм и программное обеспечение для управления режимами высокоплотностного культивирования *Hbt. salinarum*, обеспечивающий



возможность задавать направленность биосинтетических активностей клеток галоархей. Впервые в качестве источника аминокислот и ростовых факторов при культивировании галоархей *Hbt. salinarum* предложено использовать ферментоллизаты зерновых. Разработан рациональный режим процесса распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum* и длительного хранения высушенной биомассы, изучен характер сопутствующих повреждений клеток продуцентов.

Автором **доказано**, что при нестерильном культивировании экстремально галофильных архей и высокогалотолерантных бактерий возможна контаминация и быстрое замещение исходных культур микроорганизмов-продуцентов. Впервые показана возможность развития негалотолерантных бактерий рода *Bacillus* совместно с экстремально галофильными археями или высокогалотолерантными бактериями в условиях экстремально высокой солености среды и возможность индукции галовирусов непосредственно в ходе культивирования экстремально галофильных архей, что перспективно для решения проблемы фаголизиса при промышленном использовании этих культур.

Из микробных сообществ гиперсоленых сред выделены бактериальные культуры с высокой уреазной активностью и способностью к биокальцинированию, изучена возможность использования биопрепаратов на их основе для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона.

#### **Научно-практическая значимость результатов исследования**

Автором разработаны составы новых синтетических и комплексных питательных сред для культивирования промышленных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*, которые можно распространить и на другие экстремально галофильные микроорганизмы. Практический интерес представляет среда на основе ферментоллизатов зерновых, максимально обеспечивающая потребности клеток для высокоэффективного биосинтеза каротиноидов.

Получены высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum* для биотехнологического применения: новые штаммы-продуценты фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина, отличающиеся сниженным уровнем спонтанных мутаций; штамм-продуцент  $S_{50}$ -каротиноидов, обладающий повышенной устойчивостью к поражению вирусами. Наиболее перспективные для практического использования новые культуры экстремальных галлофилов депонированы в официальных Коллекциях микроорганизмов – во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НБЦ ВКПМ и коллекции уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения UNIQEM, что подтверждено соответствующими свидетельствами о депонировании микроорганизмов.

Подобраны оптимальные условия, обеспечивающие высокую эффективность процесса культивирования галоархей *Hbt. salinarum*, включающие способ подготовки посевного материала, внесение антиоксидантов, режимы и спектральные характеристики освещения

культур. Оптимальные условия разработаны для непрерывного и высокоплотного режимов культивирования штаммов-продуцентов каротиноидов и бактериородопсина промышленного уровня.

Создан высокоавтоматизированный комплекс для культивирования галофильных микроорганизмов. Результаты исследований использованы в опытно-промышленном регламенте получения бактериородопсина и высушенной субстанции галоархей, а также получения препаратов высокоочищенного трансмембранного белка бактериородопсина. Разработано программное обеспечение "BioDrome 3.0" для управления биосинтетическими процессами, в которое интегрирована экспресс-методика определения содержания бактериородопсина. Следует отметить, что автоматизированный комплекс для культивирования микроорганизмов, 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.

Определены режимы распылительной сушки биомассы галоархей *Hbt. Salinarum*, обеспечивающие оптимальные условия сохранения целостности как клеток, так и накопленных в них каротиноидов.

Определены подходы, снижающие вероятность контаминации и её отрицательные эффекты, как-то: подавление роста и лизис целевых культур при развитии посторонней микрофлоры и вирусного заражения.

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. В основе биопрепарата использованы чистые культуры бактерий *Lysinibacillus macroides*, выделенные из микробного сообщества гиперсоленого озера.

Техническая новизна и практическая значимость исследований, проведенных С.В. Калёновым, подтверждается патентами на изобретения Российской Федерации.

#### **Рекомендации по использованию результатов диссертации**

Комплексный подход автора диссертационного исследования к разработке управляемого культивирования экстремально галофильных микроорганизмов может служить основой для широкого их внедрения как новых перспективных продуцентов широкого спектра уникальных биологически активных соединений и клеточных компонентов.

Препараты бактериородопсина высокой степени очистки по-прежнему представляют интерес для конструирования фотоиндуцированных искусственных биосистем генерации электроэнергии, получения мембраногенного водорода, голографической интерферометрии, протезированию зрения и ряда других работ. Практическое внедрение всех



этих технологий требует большое количество светочувствительного белка, что возможно только при разработке промышленных объемов его получения.

Клеточные компоненты и биологически активные соединения галоархей *Hbt. salinarum* и других экстремально галофильных могут рассматриваться как основа для создания новых уникальных медицинских препаратов комплексного действия. Так, мембран-ассоциированные протеазы галоархей интересны долговременной стабильностью при физиологической температуре. Специфические каротиноиды галоархей являются прекрасными протекторами от активных форм кислорода для ферментов, ДНК и других биологически активных соединений. Стабилизированный (иммобилизованный) лизат клеток галоархей *Hbt. salinarum* может быть успешно использован в лечении и профилактике различных заболеваний, в том числе, кожных. В ветеринарии и косметологии, по мнению ряда авторов, возможно использование различных аналогов фитогормонов, осморегуляторов и антиоксидантов галоархей и экстремально галофильных бактерий. Подтверждением этого является тот факт, что внедрением таких продуктов в широкий оборот занимаются множество стартапов.

Результаты, представленные в диссертации Сергея Владимировича Калёнова, могут быть использованы организациями, занимающимися исследованиями и разработками биомолекулярных устройств и новых биопрепаратов для медицины, косметологии и сельского хозяйства, таких как: Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Институт радиотехники и электроники им. В.А.Котельникова РАН, 1-ый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина и др.

Результаты работы по иммобилизованному биопрепарату, обладающему высокой биокальцинирующей способностью, могут быть востребованы в Научно-исследовательском проектно-конструкторском и технологическом институте бетона и железобетона – НИИЖБ им. А. А. Гвоздева, специализирующемся на разработках долговечных железобетонных конструкций.

#### **Достоверность и обоснованность результатов и выводов исследования**

Представленные в работе научные положения и выводы основаны на обширном аналитическом экспериментальном материале, в полной мере подтверждены результатами исследований и отражены в многочисленных публикациях С.В. Калёнова. Достоверность экспериментальных результатов исследований разных экстремально галофильных микроорганизмов обусловлена применением современных методов и оригинальных методик, разработанных автором. Высокая воспроизводимость результатов, показанная с применением статистических методов, подтверждает основные концепции, изложенные в диссертационной работе.

Основные результаты исследований, изложенные в диссертационной работе С.В. Калёнова, к настоящему времени внедрены на производственных



участках, доложены на конференциях высокого уровня и отражены в публикациях.

### **Оценка содержания диссертации**

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

**Во введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цель и задачи, показаны научная новизна и практическая значимость.

**В главе 1 «Обзор литературы»** представлен анализ имеющихся знаний о галофильных микроорганизмах, их экологии, биологии и биотехнологическом потенциале. Автором приведена общая характеристика экстремофильных и полиэкстремофильных микроорганизмов с акцентом на галофильные бактерии и археи; описаны различные особенности гиперсоленых сред обитания, природа стрессорного воздействия таких сред на биоту; дано описание таксономического разнообразия галофильных микроорганизмов; рассмотрены геохимические и экологические особенности классических примеров гиперсоленых ценозов. Проведен анализ ряда физиологических, молекулярно-биологических и биохимических особенностей галофилов. Описан биотехнологический потенциал галофильных бактерий и архей как продуцентов целевых веществ. Автором проведен анализ имеющихся данных о подходах к культивированию и оптимизации ростовых сред и условий культивирования галофильных микроорганизмов; рассмотрены проблемы и примеры культивирования галофилов в опытно-промышленных и промышленных масштабах; особое внимание уделено разработке процесса сохранения биохимической стабильности и активности клеток микроорганизмов, в том числе галофильных.

**В главе 2 «Материалы и методы исследования»** описаны объекты исследования и методы, примененные в работе. Особого внимания в этой главе заслуживают оригинальные методики культивирования экстремально галофильных микроорганизмов и экспресс-методика анализа содержания бактериородоспина, которая внедрена в контур анализа и управления в программном обеспечении “BioDrome 3.0”.

**В главе 3 «Результаты и обсуждение»** приведены и проанализированы основные экспериментальные данные. Автором проведен выбор и оптимизация питательных сред (синтетических и комплексных) для промышленного использования при культивировании экстремально галофильных микроорганизмов. Разработаны основные способы культивирования *Hbt. salinarum* для достижения высокой плотности клеток и выхода целевых компонентов, оптимизированы условия освещения, внесение антиоксидантов и применение адсорбентов в процессах культивирования, приведено описание высокоавтоматизированного комплекса и программного

обеспечения, необходимого для культивирования галофилов. Показана возможность использования ферментативных гидролизатов зерновых для культивирования и производства биомассы *Hbt. salinarum*. Исследованы условия хранения биомассы *Hbt. salinarum*, регидратации после высушивания и проведена оптимизация сохранения внутриклеточных каротиноидов. Представлены технико-экономические показатели производства бактериородопсина и биомассы *Hbt. Salinarum*. Представлены результаты исследований карбонатогенеза бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, которые используются для улучшения свойств и защиты бетона, а также данные по разработке биопрепарата на основе этих бактерий.

**Личный вклад соискателя состоит** в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы: постановке проблемы, разработке и апробации экспериментальных методов, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей, представлении полученных результатов на конференциях.

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.

**Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы**, дает полное представление о большом объеме, высоком научном уровне и достоверности результатов проведенных исследований и соответствует установленным требованиям.

#### **Замечания и рекомендации:**

По диссертационной работе Калёнова С.В. имеются вопросы и замечания, которые не имеют принципиального характера и не снижают общей высокой оценки работы.

1. Автором глубоко и всесторонне проанализирован отечественный и зарубежный опыт по рассматриваемой проблеме, но, на наш взгляд, литературный обзор (234 с.) следовало сократить в объеме, учитывая, что глава «Результаты и обсуждение» составляет 123 стр.

2. Автором при использовании тепловой обработки и ферментного препарата Протосубтилин ГЗх получены энзиматические гидролизаты на основе пшеницы и ячменя, на которых, как источниках аминокислот и ростовых факторов, *Hbt. salinarum* 353П накапливает биомассу и каротиноиды. К сожалению, автор не приводит полный состав полученных гидролизатов, в том числе, углеводный, который также мог повлиять на выход целевых продуктов.

3. Как согласуется характеристика бактерий рода *Bacillus*, известная из источников литературы, с выводом автора: «Множество активно размножающихся при совместном культивировании бактерий рода *Bacillus*, выделенных из экстремально соленых сред, обладают широким диапазоном



устойчивости к NaCl, а некоторые и возможностью роста (от минимальной концентрации до 15%) в монокультуре»?

4. Результаты диссертационной работы использованы в опытно-промышленном регламенте получения бактериородопсина и высушенной субстанции галоархей, а также получения препаратов высокоочищенного трансмембранного белка бактериородопсина. Может ли Ваша разработка (автоматизированный комплекс и программное обеспечение) быть адаптирована для управления иными (не связанными с галофильными микроорганизмами) биотехнологическими процессами, может ли она адаптироваться для процесса промышленного уровня и была ли проведена промышленная апробация результатов исследований?

5. Известно, что у галоархей *Hbt. salinarum* биосинтез основного энергопоставляющего белка бактериородопсина на генетическом уровне (ген *bor*) активируется светом. Именно свет обеспечивает формирование трансмембранного градиента для синтеза АТФ. Что нового показали Вы в своих исследованиях галофильных культур с точки зрения расширения представлений о возможностях позитивного воздействия освещения при массовом культивировании галоархей?

6. Какие подходы, на Ваш взгляд, с точки зрения промышленной биотехнологии, более перспективны и продуктивны при работе с галофилами – использование чистых культур или сообществ микроорганизмов? Исходя из результатов исследований, использование каких нестандартных методов позволило повысить уровень синтеза и продуктивность культур галоархей до промышленного?

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Калёнова Сергея Владимировича представляет собой полную и завершённую научно-квалификационную работу, обладающую высокой научной и практической значимостью, в которой на основании выполненных автором исследований изложены новые научно обоснованные технологические решения по культивированию экстремофилов, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие страны. Диссертация содержит результаты, полученные на основании исследований, проведенных на высоком научно-методическом уровне с применением современных методов исследования, и вносит значительный вклад в развитие биотехнологии экстремально галофильных микроорганизмов. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором, теоретически обоснованы и не вызывают сомнений. Диссертационное исследование Калёнова Сергея Владимировича соответствует паспорту специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020), а ее автор Калёнов Сергей Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора



технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа Калёнова С. В. обсуждена и одобрена на заседании кафедры биохимии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» 29 апреля 2021 года, протокол № 8. Присутствовало на заседании 14 человек, в обсуждении приняло участие 5 человек. Результаты голосования: «за» – 14 человек, «против» – нет, «воздержались» – нет.

Доктор биологических наук, профессор,  
проректор по научной  
и инновационной деятельности  
ФГБОУ ВО

«Воронежский государственный  
университет инженерных технологий»,  
заведующая кафедрой биохимии  
и биотехнологии ВГУИТ

Корнеева Ольга Сергеевна

394036, Россия, г. Воронеж, проспект Революции, д. 19,  
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный  
университет инженерных технологий».  
Тел.: 8-910-343-6201  
E-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

