

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Воловой Татьяны Григорьевны на диссертационную работу Скибы Екатерины Анатольевны «Биотехнологическая трансформация легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты», представленную на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Актуальность и научная значимость диссертационной работы Скибы Екатерины Анатольевны, направленной на применение для биосинтеза целевых продуктов биотехнологии отходов и продуктов переработки возобновляемого растительного сырья, обоснована соответствием решенных задач вызовам, с которыми человечество сталкивается сегодня. Это исчерпаемость сырьевых и энергетических ресурсов, возрастающий дефицит пищи, глобальное загрязнение окружающей среды продуктами техносферы, для решения которых, наряду с традиционными технологиями и средствами, все большее значение приобретают технологии и продукты, получаемые в процессах биотехнологии.

Разнообразие микроорганизмов, широкий органотрофный потенциал, вариабельность и адаптивность метаболизма позволяют получать широкий спектр востребованных продуктов пищевого, медицинского и технического назначения с использованием углеродного сырья различного происхождения, различной степени восстановленности и стоимости. Затраты на С-субстрат в процессах биотехнологии весьма значительны и составляют не менее 40-45% от общих затрат, поэтому изыскание новых и доступных субстратов, включая отходы, – одна из ключевых проблем биотехнологии. Растительное сырье, отходы и продукты его переработки являются возобновляемым и практически неисчерпаемым источником для биосинтеза целевых продуктов. Сегодня значительную часть этанола производят из древесного сырья или сырья пищевого назначения, что породило дефицит и значительный рост цен на него на мировом рынке. В связи с этим актуальны исследования, направленные на разработку и внедрение инновационных технологий производства биоэтанола второго поколения с использованием в качестве углеродного сырья гидролизатов низкосортных растительных отходов и малоценных аграрных культур. Подавляющее количество известных

технологических решений биосинтеза наноцеллюлозы основано на использовании кристаллических сахаров, прежде всего, глюкозы. Тенденция самых последних лет – поиск доступных субстратов, среди которых рассматривают мелассу, растительные гидролизаты, жиросодержащие отходы, глицерин. В этой связи актуальность диссертационной работы, направленной на превращение доступного целлюлозосодержащего сырья в процессах биотехнологии в продукты с высокой добавленной стоимостью (биоэтанол и бактериальную наноцеллюлозу), не вызывает сомнения.

Цель диссертационной работы Скибы Е.А. – фундаментальное обоснование, разработка и реализация новых биотехнологических процессов трансформации легковозобновляемого недревесного целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты микробиологического синтеза. Все сформулированные для достижения цели задачи (химическая обработка исходного сырья для получения субстратов, пригодных для микробиологического синтеза, получение научной основы, разработка и реализация технологий биосинтеза биоэтанола и бактериальной наноцеллюлозы), успешно решены соискателем в ходе выполненных многопрофильных и глубоких исследований.

Структура диссертационной работы соответствует действующим требованиям, состоит из введения, обзора литературы, описания использованных объектов и методов; трех глав, содержащих описание результатов экспериментальных исследований; заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 1118 источников, а также 9 приложений. Диссертация изложена на 492 страницах машинописного текста. Описание результатов выстроено логически, хорошо структурировано и иллюстрировано 71 рисунком и 53 таблицами; представленные в каждой главе результаты завершаются обобщением.

Во Введении аргументирована актуальность темы исследования, обоснованы цель работы и задачи для ее достижения; сформулированы научная и практическая значимость, защищаемые положения.

Глава 1 (Обзор литературы) содержит материал, который дает представление о ключевых проблемах и трендах в предметной области диссертационной работы. Обзор выполнен на высоком профессиональном уровне,

включает классическую советскую техническую литературу и анализ самых современных работ РФ и зарубежных авторов. Аналитический обзор логично выстроен и системно структурирован; начинается с классификации целлюлозосодержащего сырья, его химического состава, методов предварительной обработки и детоксификации. Аргументированы преимущества использования ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья по сравнению с химическим гидролизом.

Большое внимание уделено новому и перспективному продукту – бактериальной наноцеллюлозе (БНЦ), технологии получения, свойствам и применению. Показано, что БНЦ, благодаря уникальным свойствам, имеет широкие перспективы в пищевой и бумажной промышленности, медицине и фармакологии. Акцентируется, что для расширения масштабов и областей применения бактериальной целлюлозы необходимо совершенствование технологии биосинтеза за счет поиска продуктивных штаммов, обеспечивающих высокие выходы этого ценного биотехнологического продукта на доступном сырье различного происхождения. Это подчеркивает значимость представленной работы, решающей вопросы создания отсутствующей в России технологии получения БНЦ с использованием нового и доступного углеродного субстрата.

Сформулированное обоснование выбора направления и методологии исследований диссертационной работы базируется на глубоком анализе соискателя мировых достижений с учетом необходимости восполнения имеющихся пробелов в области фундаментальных исследований и достигнутом уровне техники.

В Главе 2 (Объекты и Методы) представлены объекты и методы исследования, которые включают методологию и инструментальные возможности химии, микробиологии, «белой» биотехнологии и материаловедения. Охарактеризовано используемое растительное сырье, химические и ферментативные процессы его обработки. С различной степенью подробностей описаны методы исследований; в случае исследования БНЦ разработаны авторские методики детектирования структуры и свойств; использованы современные математические методы планирования многофакторных экспериментов и обработки результатов. Набор и уровень привлеченных экспериментальных

методов и использование статистической обработки свидетельствуют о достоверности результатов.

Третья экспериментальная глава посвящена разработке и исследованию процессов трансформации целлюлозосодержащего сырья под действием химических реагентов и последующего ферментативного гидролиза в углеродный ростовой субстрат, пригодный для микробиологического синтеза биоэтанола и бактериальной наноцеллюлозы. Показана эффективность всех предложенных вариантов химической обработки исходного сырья с применением азотной кислоты и щелочи, а также комбинированных вариантов, обеспечивающих значительное увеличение содержания целлюлозы в шелухе овса и биомассе мискантуса по сравнению с исходным сырьем. Впервые использование в предобработке исходного сырья азотной кислоты позволило после стадии ферментативного гидролиза получить из обоих источников гидролизаты с доминирующим содержанием глюкозы. Показано, что отработанный раствор азотной кислоты можно рассматривать в качестве комбинированного лигноуミノвого удобрения, стимулирующего развитие растений, а озоление воздушно-сухих навесок образцов шелухи овса, продукта его азотнокислой обработки и твердого остатка, остающегося после ферментативного гидролиза продукта азотнокислой обработки, обеспечивает получение золы с высоким содержанием диоксида кремния, также являющегося ценным дополнительным продуктом; это позволяет говорить о безотходности разработанных процессов переработки растительного сырья, включающих предварительную химическую обработку кислотой и щелочью и последующий ферментативный гидролиз.

В четвертой главе полученные из растительного сырья варианты сахаросодержащих субстратов исследованы для синтеза биоэтанола. Детально проработана каждая стадия технологического процесса, с привлечением математических методов планирования и обработки результатов проведена оптимизация ряда стадий, включая состав РВ в питательной среде, выход этанола, содержание примесей в нем, длительность процесса и др. Остаточные сахара, несброженные в процессе анаэробного биосинтеза этанола, исследованы и положительно оценены в качестве питательной среды для культивирования дрожжей и получения еще одного целевого продукта – белка одноклеточных.

Представлено описание исходных данных, разработанной технической документации; выполнено масштабирование разработанной технологии получения биоэтанола в условиях опытного производства; проведены предварительные технико-экономические расчеты процесса.

Пятая глава содержит результаты исследования биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы из возобновляемого целлюлозосодержащего сырья. На основе скрининга штаммов продуцентов, выращиваемых на средах, полученных из растительных гидролизатов, показана перспективность применения симбиотической культуры *Medusomycesgisevii* Sa-12; проведено сравнительное исследование влияния типа и состава растительных гидролизатов, полученных различными способами из различных растительных источников, на продукцию наноцеллюлозы, ее структуру и свойства. Результаты позволили подготовить техническую документацию, разработать и реализовать в масштабированном варианте технологию получения бактериальной наноцеллюлозы на новом и доступном субстрате, выполнить предварительную технико-экономическую оценку и оценить перспективность применения БНЦ в ветеринарии и медицине.

Итоговый раздел диссертации включает Заключение и сформулированные Выводы.

Безусловная научная новизна работы включает получение новых фундаментальных знаний о процессах и закономерностях трансформации возобновляемого целлюлозосодержащего сырья в доступные и эффективные ростовые С-субстраты, пригодные для микробиологического синтеза востребованных целевых продуктов (биоэтанола и бактериальной наноцеллюлозы, а также белка одноклеточных) и в ценные побочные продукты (лигногуминовое удобрение, диоксид кремния). Полученные научные результаты обеспечили разработку и реализацию в масштабированных вариантах новой технологии трансформации доступного растительного сырья в продукты с высокой добавленной стоимостью методами биотехнологии. Впервые для предобработки целлюлозосодержащего сырья в субстраты, пригодные для микробиологического синтеза, предложено использовать разбавленные растворы азотной кислоты, что обеспечило реализацию эффективного биотехнологического процесса полного цикла – от исходного растительного сырья через получаемые сахаросодержащие

субстраты до получения востребованных и социально значимых целевых продуктов. Разработанные и реализованные технологии обладают несомненными преимуществами перед известными мировыми аналогами, среди которых безотходность, технологичность, экологичность и экономичность. Убедительно показана возможность замены древесного и пищевого сырья доступным и малоценным целлюлозосодержащим сырьём для получения углеродных субстратов, трансформируемых в процессах микробного метаболизма и биосинтеза в продукты с высокой добавленной стоимостью.

Полученные теоретические основы и разработанные технологии трансформации легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в биоэтанол и бактериальную наноцеллюлозу **имеют большое практическое значение и заслуживают рекомендации к внедрению.** Реализация соискателем разработанных технологий в масштабированных до опытного уровня вариантах имеет высокую степень готовности для последующего масштабирования и создания в России первого опытно-промышленного производства на новых видах субстратах, это внесет вклад в возрождение гидролизной промышленности РФ и будет способствовать становлению новой биотехнологической отрасли – получению бактериальной наноцеллюлозы для различных областей применения.

Нельзя забывать, что события 90-х - начала нулевых годов, драматически и негативно сказавшиеся на микробиологической отрасли России в целом, привели к практически полному развалу мощной гидролизной промышленности, созданной в СССР. Это также негативно сказалось на уровне проводимых научных исследований, так как многие научные учреждения утратили возможность проводить затратные и сложные исследования, ориентированные на разработку новых технологий биосинтеза целевых продуктов, их реализацию с масштабированием и созданием опытных производств. Это на годы затормозило развитие работ по новым перспективным процессам получения ценных продуктов биотехнологии, включая разрушаемые микробные биопластики, бактериальную наноцеллюлозу, водорослевые углеводороды и др. В этой связи диссертационную работу Скибы Е.А. справедливо рассматривать в качестве знакового события, имеющего большое значение для развития фундаментальной и практической биотехнологии и готовой к внедрению.

Инновационный аспект диссертационной работы включает 7 патентов РФ на изобретения, серию разработанных и зарегистрированных в органах стандартизации и метрологии РФ Технических условий, технических прописей и технологических регламентов на получение полноценных ростовых С-субстратов, обеспечивающих продуктивный синтез востребованных целевых продуктов.

Следует подчеркнуть, что результаты, представленные к защите и изложенные в диссертационной работе, широко и достойно опубликованы в представительной серии журнальных статей (72), это многократно превышает количество, требуемое при защите докторских диссертаций, из которых 48 – в журналах, индексируемых международными базами Web of Science и Scopus, в том числе 19 – в категории журналов Q1 и Q2, что свидетельствует о мировом уровне работ.

В качестве вопросов и замечаний к содержанию диссертации можно отметить следующее:

1. Помимо основных продуктов (биоэтанола и БНЦ), в работе с различной степенью подробности сообщается о кормовом белке, комбинированном лигногуминовом удобрении, диоксиде кремния, которые в силу значимости заслуживают большего внимания, и их целесообразно было включить в постановочный и результирующий разделы работы.

2. Следовало оперировать унифицированной терминологией, так как в используемой присутствуют неточности и разночтения, например, в защищаемых положениях значится, что «разработана промышленная технология получения этанола», в выводах уровень масштабирования технологии обозначен как опытно-промышленный, при этом наработаны опытные образцы продукции, которые в Актах испытания значатся экспериментальными. Исходя из общепринятых критериев масштабирования и требованиям к ним, корректно уровень реализации биотехнологий с применением разработанного С-субстрата называть опытным, а не опытно-промышленным.

3. В разделе, характеризующем процессы химического и ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья, не рассматривается значимый параметр – массообмен; это вызывает вопросы – как перемешивание среды влияет на протекание и эффективность кислотного и щелочного и, в особенности,

ферментативного гидролиза растительного сырья; также не удалось найти степень измельчения исходного растительного сырья и размеры частиц.

4. При кислотной обработке исходного целлюлозосодержащего сырья использовали раствор азотной кислоты различной концентрации; возникает вопрос, какой смысл соискатель вкладывает в показатель кислотности, выраженный в %, и как его измеряли?

5. Анализ полученных значений констант Михаэлиса-Ментона указывает на довольно слабое сродство фермента к перерабатываемому субстрату. При этом при переходе от ПАО шелухи овса к ПАО мискантуса значение увеличивается практически в два раза, что говорит о том, что сродство ПАО мискантуса к ферментам еще ниже; чем это можно объяснить, если в обоих случаях основным субстратом для ферментов является целлюлоза? Может ли это свидетельствовать о наличии диффузионных ограничений в реакционной среде при проведении ферментативного гидролиза?

6. Стандартная загрузка дрожжей при производстве спирта обычно составляет 20-30 г/л (2-3%), в работе приведены необычно высокие значения стартовой концентрации дрожжей, от 8,0-12,0 % (стр. 241) до 15,0 % (стр. 244), как это мотивируется?

7. Озадачило предположение о том, что «скорость сбраживания линейно зависит от концентрации утилизируемых в биоэтанол РВ» (стр. 247), при этом скорость потребления субстратов в микробиологических процессах имеет нелинейные зависимости (чаще экспоненты). На каком основании сделано такое допущение? Приведенные на рисунке 4.4 результаты не свидетельствуют о линейном характере зависимостей.

8. На рисунке 4.8 после стадии брожения отсутствует сепаратор или центрифуга для отделения дрожжей от барды, это мотивируется как достижение, но следует объяснить, чем обосновано такое решение.

9. Не ясно, каким образом из 60,0 г целлюлозы при 100 % конверсии, получено 66,67 г глюкозы (стр. 264).

10. При характеристике статуса микробных культур использован один показатель (счет числа клеток в камере Горяева); желательно использование продукционных и кинетических показателей культуры.

11. Фразу на стр. 241 «...при проведении процесса биосинтеза бактериальной целлюлозы в нестерильных условиях снижается риск контаминации питательной среды», по всей видимости, следует воспринимать в качестве случайной технической ошибки. Напротив, при нестерильной ферментации риск контаминации велик. Возможно, имели в виду процесс закисления культуральной (не питательной) среды по мере трансформации сахаров как фактор, снижающий риск закрепления в культуре спутников.

В тексте встречаются терминологические неточности и неудачные формулировки и выражения; объем Главы 1 (Обзор литературы) весьма велик (свыше 120 страниц), а в Главе 2 (Объекты и Методы) часть значимой информации не представлена полно, и это вызывает вопросы.

Однако эти вопросы и замечания носят рекомендательный и дискуссионный характер, не являются принципиальными и не умаляют достоинств и соответствия представленной к защите диссертационной работы, поскольку полученные результаты обладают новизной, высокой научной и практической значимостью. Это позволяет заключить, что диссертационная работы Скибы Е.А. является завершенной научно-квалификационной работой и оригинальным исследованием, выполнена на высоком методическом уровне, в ней получены новые фундаментальные знания, пионерные научно обоснованные технические и технологические решения, которые вносят вклад в развитие биотехнологии в РФ.

Автореферат диссертации полностью соответствует представленной диссертационной работе. Выводы, сделанные в работе, соответствуют поставленным целям и задачам, а их обоснованность подтверждена совокупностью полученных результатов.

По объему и методическому уровню выполненных исследований, актуальности и новизне результатов, их значимости для науки и практики результаты диссертационной работы «Биотехнологическая трансформация легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты», представленная на официальное оппонирование, полностью удовлетворяет требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в редакции от 26.09.2022), предъявляемым ВАК Министерства науки и высшего

образования РФ к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а ее автор Скиба Екатерина Анатольевна заслуживает присуждения учёной степени доктора технических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Официальный оппонент: доктор биологических наук по специальности 03.00.07 – Микробиология, профессор по кафедре физиологии и микробиологии, заведующая базовой кафедрой биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет».



Волова Татьяна Григорьевна

22.12.2022

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (ФГАОУ ВО СФУ);
660041, Красноярский край, г. Красноярск, пр. Свободный, 79;
Телефон/факс: +7 (391) 244-86-25
E-mail: office@sfu-kras.ru
Сайт: <http://www.sfu-kras.ru/>
Моб.: +7(902) 912 79 20; e-mail: volova45@mail.ru

Подпись Воловой Т.Г. удостоверяю:
Учёный секретарь учёного совета
ФГАОУ ВО СФУ


Ю. Макарчук



«22» декабря 2022 г.