

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию Фахрии Тахир Кызы Мамедовой «Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам её биокаталитической трансформации», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Ф.Т. Мамедовой посвящена исследованию различных подходов к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам её биокаталитической трансформации в органические кислоты (мономеры для получения биоразлагаемых полимеров) и биополимеры в виде ПГА.

Актуальность темы диссертации объясняется современными общемировыми и российскими тенденциями технологического развития, нацеленными на разработку и использование процессов, обеспечивающих получение коммерчески ценных продуктов за счет утилизации существующих отходов и трансформации возобновляемых видов сырья с минимальной экологической нагрузкой. Важнейшей задачей в данном контексте является получение продуктивных видов биомассы для осуществления экономически целесообразной биотехнологической конверсии с производством ценных биопродуктов. Как известно, фототрофные микроорганизмы, способные к 20-30-кратному превышению скорости накопления биомассы по сравнению с сельскохозяйственными культурами и не требующие для культивирования использования больших площадей полезных сельскохозяйственных угодий, признаны наиболее перспективным источником наработки больших объемов биомассы. Поскольку клетки микроводорослей являются источником углеводов, белков и липидов как основы для производства различных целевых продуктов в процессе биотехнологической трансформации, автор исследования предположил и доказал возможность совмещения процессов получения биомассы микроводорослей и производства ряда востребованных продуктов (молочной, фумаровой, янтарной кислоты, ПГА, метана, пиролизной нефти) с актуальной задачей очистки промышленных сточных вод, богатых биоорганическими соединениями. Активный ил, традиционно используемый для очистки сточных вод, не обеспечивает возможности дальнейшей трансформации накапливаемой биомассы в полезные продукты в силу непостоянства её химического состава.

Поэтому в ходе исследований решался целый комплекс задач, относящихся ко всем стадиям возможного биотехнологического производства, включая:

- высокопродуктивное культивирование биомассы штаммов *C. vulgaris* и продолжительное хранение клеток микроводорослей с сохранением высокой пролиферативной активности;
- предварительную обработку биомассы для повышения эффективности конверсии;
- переработку биомассы микроводорослей с применением высокоэффективных биокатализаторов для получения коммерческих продуктов и, прежде всего, таких актуальных, какими являются биоразлагаемые полимерные материалы.

На сегодняшний день существуют многочисленные публикации, посвященные отдельным проблемам из вышеперечисленных, комплексный подход, продемонстрированный в работе Ф. Т. Мамедовой и объединяющий технологии биологической очистки сточных вод и накопления биомассы микроводорослей в качестве сырья для получения различных промышленных продуктов, представляется мало изученным, хотя весьма актуальным и экономически востребованным. Таким образом, диссертация Ф.Т. Мамедовой интересна не только с научной стороны, но и с точки зрения её практической значимости.

Научная новизна представленной работы определяется тем, что автором впервые разработан оригинальный способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов путем их иммобилизации в криогель ПВС, обеспечивающий продолжительное хранение клеток (не менее 1,5 лет) при сохранении у них пролиферативной функции на 90÷95 %.

Показано, что применение высококонцентрированного иммобилизованного инокулята позволило увеличить скорость процессов очистки сточных вод и накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris* для её трансформации в различные целевые продукты.

Впервые показано, что для получения максимальной концентрации ВС в гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, необходимо использовать комбинированную обработку клеток: механическую деструкцию и ферментативный гидролиз с использованием ферментных препаратов класса целлюлаз и амилаз.

Установлены оптимальные условия применения иммобилизованных клеток мицелиальных грибов рода *Rhizopus* для биотрансформации ВС, содержащихся в ферментолизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, в МК и ФК.

Предложен подход к утилизации биомассы мицелиальных грибов рода *Rhizopus*, многократно использованных в процессах получения органических кислот, с применением методов метаногенеза и быстрого пиролиза с получением, соответственно, метана и пиролизной нефти. Показана возможность увеличения выхода метана при обогащении биомассы мицелиальных грибов биомассой микроводорослей *C. vulgaris*.

Впервые установлено, что для биотехнологического получения ПГА с применением в качестве продуцентов клеток бактерий *C. necator* могут быть использованы гидролизаты биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

Диссертационная работа Ф.Т. Мамедовой состоит из введения, обзора литературы (глава I), описания материалов и методов исследования (глава II), результатов и обсуждения (глава III), выводов и списка литературы (221 библиографическая ссылка). Диссертация изложена на 176 страницах печатного текста, содержит 50 рисунков и 36 таблиц.

В **главе I** представлен обзор литературы по методам и условиям культивирования биомассы фототрофных микроорганизмов для получения клеток с желаемым биохимическим составом, схемам выращивания и накопления биомассы в фотобиореакторах открытого и закрытого типа, способам хранения культур фототрофных микроорганизмов. Значительная часть обзора литературы посвящена анализу путей переработки биомассы фототрофных микроорганизмов, включая методы её предварительной подготовки, а также основных способов дальнейшей конверсии биомассы в целевые биотехнологические продукты с высокой добавленной стоимостью (органические кислоты, микробные биополимеры). На основании проведенного анализа дается оценка преимуществ и недостатков применяемых подходов и методов с точки зрения экономической целесообразности, что немаловажно для выбора оптимальных технологических решений в ходе реализации целей и задач исследования.

Во **второй главе** описаны использованные автором работы химические реактивы, приборы, штаммы микроорганизмов и источники их получения, а также источники углеводсодержащего сырья, применявшегося для

исследовательских целей в качестве различных видов биомассы: фототрофных микроорганизмов, макроводорослей и целлюлозосодержащих отходов. В данной главе представлены также методы культивирования клеток различных микроорганизмов с использованием модельных питательных сред, имитирующих бытовые сточные воды и сточные воды реальных предприятий пищевой промышленности, охарактеризованы способы иммобилизации в криогель поливинилового спирта (ПВС), методы анализа состава биоорганических компонентов биомассы клеток микроорганизмов, включая определение сухого веса (влажности) биомассы макроводорослей *C. vulgaris*, содержания в ней липидов, белков, углеводов, целлюлозы, крахмала, концентрации внутриклеточного АТФ биolumинесцентным методом для контроля выживаемости клеток микроорганизмов. Подробно описаны процедуры и приемы, использовавшиеся в экспериментальной работе, включая применявшиеся методы гидролиза клеток макроводорослей *C. vulgaris* (кислотного и ферментативного) как с этапом предварительной обработки биомассы, так и без него, способы оценки эффективности данных подходов, а также методы получения целевых продуктов из биомассы и расчета кинетических параметров процессов. Следует отметить высокий уровень информативности и полноты представления использованных в работе материалов и методов исследования.

Третья глава содержит основные результаты исследования и их обсуждение.

Было установлено, что при культивировании в сточных водах так же, как и на «классической» среде Тамия, биомасса клеток *C. vulgaris* характеризовалась практически одинаковым достаточно высоким содержанием углеводов, что сделало данную биомассу весьма привлекательным субстратом для дальнейшей биокаталитической трансформации в различные ценные продукты, а указанные виды сточных вод – пригодной средой для накопления биомассы макроводорослей *C. vulgaris*.

При исследовании возможности увеличения скорости накопления биомассы и скорости снижения ХПК сред, было предложено использовать в качестве инокулята иммобилизованные клетки макроводорослей в исходно более высокой концентрации. Для чего был разработан способ иммобилизации клеток макроводорослей *C. vulgaris* в криогель ПВС.

Также была исследована возможность многократного использования разработанного иммобилизованного инокулята для накопления биомассы клеток микроводорослей *C. vulgaris* в сточных водах различного состава.

При проведении сравнительного анализа эффективности различных способов предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, с целью получения максимальной концентрации ВС, в качестве оптимального был выбран подход, сочетающий последовательно механическую деструкцию с последующей ферментативной обработкой с использованием ферментных препаратов класса целлюлаз и амилаз.

При исследовании процессов получения молочной кислоты (МК) и фумаровой кислоты (ФК) из ферментолитатов биомассы *C. vulgaris* были оптимизированы условия биокаталитической трансформации ВС, содержащихся в ферментативных гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, в МК и ФК при использовании ИБК на основе клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* F-814 и *R. oryzae* F-1032 соответственно.

Для получения янтарной кислоты (ЯК) был разработан биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes*, показана возможность, а так же оптимизированы условия проведения периодического биотехнологического получения ЯК из ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

Проведено исследование и оптимизированы условия накопления ПГА в составе биомассы клеток *C. necator* на примере синтетических глюкозосодержащих питательных сред и показано, что ферментолитат биомассы микроводорослей является перспективной основой для сред ферментации *C. necator* с целью накопления в них ПГА.

В результате проведенных исследований была продемонстрирована возможность утилизации биомассы иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, использованных при многократном получении органических кислот из ферментолитатов клеток микроводорослей *C. vulgaris*, в процессах метаногенеза и быстрого пиролиза.

Анализ и обобщение полученных в работе результатов позволили сформулировать концепцию биотехнологического комплекса, согласно которой происходит накопление клеток микроводорослей с одновременной очисткой сточных вод и последующим использованием биомассы микроводорослей для ее

дальнейшей трансформации в целевые коммерчески значимые продукты в виде мономеров, пригодных для получения биоразлагаемых полимерных материалов, а также для получения биополимеров (например, ПГА). Кроме того могут быть получены продукты переработки отходов основного производства (биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток мицелиальных грибов) в метан и бионефть.

В разделе **выводы** суммированы и кратко изложены результаты проведенных исследований.

Диссертационная работа Ф. Т. Мамедовой написана хорошим русским языком, сопровождается большим количеством таблиц и рисунков и позволяет сделать вывод о том, что поставленные цели и задачи решены на высоком уровне с использованием современного оборудования, полученные результаты представляют не только научный, но и практический интерес. Автореферат диссертации полностью соответствует основным положениям, изложенным в диссертации. Материалы исследований опубликованы в реферируемых журналах и доложены на конференциях.

В качестве замечаний необходимо отметить:

1. Скрининг штаммов зеленых микроводорослей, полученных из разных коллекций РФ, проводился на стандартной среде Тамия с добавлением 5 г/л глюкозы. Вероятно, можно было провести скрининг штаммов микроводорослей на питательных средах, которыми являлись бы конкретные сточные воды, используемые для дальнейшей переработки. В этом случае интерес могли бы представлять штаммы микроводорослей или же их ассоциации с другими микроорганизмами, которые уже присутствуют в исследуемых образцах сточных вод.

2. При описании условий культивирования фототрофных микроорганизмов на сточных водах упомянуто, что культивирование проводили в мини-реакторе в аэробных условиях при температуре 25°C при круглосуточном освещении. Однако более подробных данных о конструкции реактора, параметрах освещенности, перемешивания, барботирования воздуха в диссертационной работе не приводится.

3. В работе используется слишком общий термин «сточные воды». Речь идет о сточных водах пищевых производств, в то время как существует множество различных видов сточных вод. Следует принять во внимание, что состав сточных вод пищевых производств весьма изменчив в зависимости от режимов работы и загрузки основных технологических линий. Было бы логично дать обоснование времени отбора проб сточных вод, использованных в работе, и показать, что отобранные образцы в достаточной степени характеризуют режимы работы очистных сооружений.

4. Многократное использование иммобилизованных клеток микроводорослей, несомненно, обладает преимуществом, поскольку посевной материал используется многократно. Однако не ясен выбор ПВС, каковы его преимущества по сравнению с другими носителями, такими как альгинат кальция, различные гидрогели (как с использованием ПВС так и без) и пр.

5. В цели и задачи данной диссертационной работы не была вынесена необходимость проведения исследований по метаногенезу и пиролизу. В работе нет обоснования выбора мезофильного метаногенеза и подбора условий проведения самого процесса. Кроме того, нет обоснований необходимости предварительной термообработки биомассы. Аналогично, не совсем понятно, почему был выбран быстрый пиролиз, и на каком основании осуществлялся отбор термодинамических параметров данного процесса.

5. Экономическая оценка разрабатываемого подхода проведена не в полном объеме, что не даёт чёткого представления об экономическом эффекте предлагаемых решений.

В целом следует отметить, что, несмотря на сделанные замечания, диссертация Ф. Т. Мамедовой «Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам её биокаталитической трансформации» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методологическом и научном уровне и имеющую значительную практическую ценность с точки зрения их возможного дальнейшего использования при разработке промышленных технологий. Диссертационная работа отвечает требованиям специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным п.9 «Положения

о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор Ф.Т. Мамедова заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

Раиф Гаянович Василев

доктор биологических наук, профессор, начальник лаборатории биотехнологии и биоэнергетики Курчатовского комплекса НБИКС-технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д.1

Тел. +7(499)1967100 (доб. 3244)

e-mail: Vasilov_RG@nrcki.ru

Подпись Р.Г. Василова заверяю.

Первый заместитель директора по научной работе
НИЦ «Курчатовский институт»
д.ф.-м.н., член-корреспондент РАН О.С. Нарайкин

«22» мая 2015 г.



СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Мамедовой Фахрии Тахир кызы на тему:

«Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам её биокаталитической трансформации»,
по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности	Основные научные труды
Василов Раиф Гаянович	Российская Федерация	Начальник лаборатории биотехнологии и биоэнергетики Курчатовского комплекса НБИКС- технологий Национального исследовательско го центра «Курчатовский институт»	Доктор биологических наук, профессор	14.00.36 – Аллергология и иммунология	<ol style="list-style-type: none"> 1. Намсараев З.Б., Василов Р.Г. Технологий прямой конверсии углекислого газа в биотопливо и биопластики с использованием генетически модифицированных цианобактерий // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2012. - Т.8. - № 4. – С. 42-51. - ISSN 1996-4741 2. Винокуров В.А., Василов Р.Г. Использование биодеструкторов для очистки территорий от нефти и нефтепродуктов: обзор // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2013. - Т.9. - № 1. – С. 51-57. - ISSN 1996-4741 3. Садрадинова Э.Р., Шестаков А.И., Абрамов С.М., Кошкарова Л.А., Митрофанова Т.И., Василов Р.Г., Нетрусов А.И. Скрининг микробных сообществ – продуцентов биоводорода // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2013. - Т.9. - № 1. – С. 43-51. - ISSN 1996-4741 4. Садрадинова Э.Р., Шестаков А.И., Абрамов С.М., Федосова В.И., Кошкарова Л.А., Митрофанова

					<p>Т.И., Василев Р.Г., Нетрусов А.И. Влияние различных факторов на эффективность процесса термофильной микробной конверсии органических отходов в биоводород // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2013. - Т.9. - № 1. – С. 52-62. - ISSN 1996-4741</p> <p>5. Намсараев З.Б., Горин К.В., Готовцев П.М., Комова А.В., Ломоносова М.А., Бутылин В.В., Шаповалова А.А., Василев Р.Г. Микроводоросли как потенциальный источник сырья для производства биоэтанола // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2013. - Т.9. - № 4. – С. 38-42. - ISSN 1996-4741</p> <p>6. Комова А.В., Намсараев З.Б., Готовцев П.М., Горин К.В., Бадранова Г.У., Василев Р.Г. Максимальная эффективность конверсии солнечной энергии в биотопливо и пути ее повышения // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2013. - Т.9. - № 4. – С. 48-51. - ISSN 1996-4741</p> <p>7. Yuzbasheva, E.Y., Gotovtsev, P.M., Mostova, E.B., Perkovskaya, N.I., Lomonosova, M.A., Butylin, V.V., Sineokii, S.P., Vasilov, R.G. Biodiesel production via enzymatic catalysis // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2014. – 50 (8), p. 737-749. – ISSN 0003-6838</p> <p>8. П.М. Готовцев, Е.Ю. Юзбашева, К.В. Горин, В.В. Бутылин, Г.У.Бадранова, Н.И. Перковская, Е.Б. Мостова, З.Б. Намсараев, Н.И. Руднева, А.В. Комова, Р.Г. Василев, С.П. Синеокий. Иммуобилизация микробных клеток для биотехнологических производств. Современные</p>
--	--	--	--	--	---

					решения и перспективные технологии // Биотехнология. – 2015. – № 2. – С. 8-21. – ISSN 0234-2758
--	--	--	--	--	---

Василов Раиф Гаянович

Доктор биологических наук, профессор,
Начальник лаборатории биотехнологии и биоэнергетики Курчатовского комплекса НБИКС-технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Тел.: +7(499)1967100 (3244), моб. +7(985)2625010

e-mail: Vasilov_RG@nrcki.ru

Подпись Р.Г. Василова заверяю

Первый заместитель директора по научной работе
НИЦ «Курчатовский институт»
д.ф.-м.н., член-корреспондент РАН О.С. Нарайкин

