

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Мамедовой Фахрии Тахир Кызы “Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chrorella vulgaris* и к процессам ее биокаталитической трансформации“, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

В настоящее время использование сточных вод, богатых биоорганическими соединениями, в качестве питательных сред для культивирования микроводорослей представляется перспективным, поскольку позволяет разработать объединенные технологии биологической очистки водных ресурсов и накопления биомассы микроводорослей в качестве сырья для получения различных промышленных продуктов. Такие комплексные процессы могут стать экономически обоснованным дополнением к традиционному процессу очистки сточных вод на основе активного ила.

Следует отметить, что в настоящее время особое внимание уделяется получению с помощью биотехнологических методов биоразлагаемых полимерных материалов, которые могут заменить полимеры, традиционно получаемые химическим синтезом. Особый интерес представляет синтез полимерных материалов, где мономерами для синтеза являются получаемые различными биотехнологическими способами органические кислоты, например, такие как молочная (МК), фумаровая (ФК), янтарная (ЯК). Особо хочется отметить, что биоразлагаемые полимерные материалы, например, полигидроксиалканоатов (ПГА) или полилактиды, полилактиды-ко-гликолиды, синтезированные из мономеров, полученных бисинтезом, находят все более широкое применение в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Несмотря на то, что в развитых странах эта область медицинской биотехнологии очень быстро развивается на протяжении последних 8-10 лет, в России в этом направлении делаются только первые шаги. Расширение сырьевой базы для производства таких мономеров, главным образом, за счет

использования возобновляемых источников сырья является, безусловно, актуальной задачей в ближайшем будущем.

С другой стороны, использование в процессах биосинтеза биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток подтвердило перспективность их применения перед свободными клетками. Основными достоинствами таких биотехнологий, как известно, являются возможности их длительного хранения и многократного использования с улучшением основных характеристик процессов (продуктивности, выхода продукта и т.д.), что приводит к упрощению и удешевлению технологического оформления процессов.

Целью представленной диссертационной работы являлось исследование различных подходов к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам её биокаталитической трансформации в органические кислоты (мономеры для получения биоразлагаемых полимеров) и биполимеры в виде ПГА.

Таким образом, данная работа, направленная на изучение и разработку процессов накопления биомассы микроводорослей и биокаталитической трансформации в различные органические кислоты (МК, ЯК, ФК) и полимеры из класса ПГА, в том числе с помощью различных биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток грибов и бактерий, безусловно, актуальна.

Научная новизна работы состоит в том, что автором впервые показано, что для получения максимальной концентрации восстанавливающих сахаров (ВС) в гидролизатах биомассы *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, используется комбинированная обработка клеток, включающая механическую деструкцию и ферментативный гидролиз с помощью ферментных препаратов класса целлюлаз и амилаз.

Оптимизированы условия применения иммобилизованных клеток грибов рода *Rhizopus* для биотрансформации ВС, которые содержатся в ферментоллизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, в МК и ФК.

Предложен метод утилизации биомассы *Rhizopus*, многократно использованных в процессах получения органических кислот, с применением метаногенеза и быстрого пиролиза. Показана возможность увеличения выхода метана при обогащении биомассы грибов биомассой микроводорослей *C. vulgaris*. При этом установлено наличие длинноцепочечных нитрилсодержащих соединений в образцах пиролизной нефти, являющихся перспективными компонентами высокоэнтальпийного топлива.

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

Практическая значимость работы состоит в том, что на основе полученных результатов может быть создана технология, объединяющая в себе эффективные биокаталитические процессы (накопление биомассы микроводорослей, сопряженное с очисткой сточных вод различного состава), и процессы трансформации гидролизатов биомассы в различные целевые продукты, в частности мономеры (МК, ФК, ЯК) или природные полимеры (ПГА).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 176 страниц печатного текста, включая 50 рисунков, 36 таблиц, 221 ссылку.

Литературный обзор написан очень четко и хорошим литературным языком, как, впрочем, и вся диссертация. Несмотря на сложность обсуждаемой проблемы, материал легко читается и усваивается, что позволяет легко следовать логике автора. В обзоре подробно описаны и проанализированы следующие аспекты, относящиеся к теме диссертации:

1.1 Биомасса фототрофных микроорганизмов как перспективный сырьевой источник для биотехнологических процессов.

1.2 Хранение культур фототрофных микроорганизмов.

1.3 Предобработка биомассы фототрофных микроорганизмов для дальнейшего получения различных биопродуктов.

1.4 Трансформация биомассы фототрофных микроорганизмов в полупродукты для синтеза биоразлагаемых полимеров.

1.4.1 Органические кислоты – мономеры для получения биоразлагаемых полимеров.

1.4.2 Полигидроксиалканоаты – микробные полимеры для получения биоразлагаемых композиционных материалов

Из литературного обзора автором делается вывод, что несмотря на то, что ведущие фирмы (Procter&Gambel, Monsanto, Terna и др.) активно инвестируют в разработку технологий производства биоразлагаемых пластиков и такие производства в настоящее время осваивают практически все развитые страны, решающим фактором для широкомасштабного получения и применения полимеров класса ПГА является снижение стоимости этих полимеров. Как известно, значительный вклад в себестоимость этих полимеров вносят расходы на углесодержащее сырье для выращивания микроорганизмов, поэтому основное внимание биотехнологов сфокусировано на расширении сырьевой базы этого производства. Такая задача может быть решена в том числе и за счет применения в качестве исходного сырья различных промышленных и сельскохозяйственных отходов, в частности, гидролизатов различных видов растительной биомассы, которая накапливается в больших количествах ежегодно.

Анализируя все доступные литературные данные, автор приходит к заключению, что диссертационная работа должна быть сфокусирована на решении следующих биотехнологических задач:

1. Разработка эффективного способа накопления биомассы свободных клеток микроводорослей *C. vulgaris* в процессе очистки сточных вод разного состава с одновременным снижением уровня их загрязнения (ХПК).

2. Оптимизация подходов к предобработке биомассы *C. vulgaris* для получения сред с максимально высокими концентрациями ВС.

3. Разработка наиболее эффективных методов получения органических кислот и ПГА при использовании сред, получаемых в результате эффективной деструкции биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

В экспериментальной части очень тщательно и подробно описаны все реагенты, протоколы культивирования клеток, методы определения целевых продуктов, а также носители для иммобилизации клеток грибов и бактерий.

Глава Результаты и обсуждение состоит из следующих 5 разделов :

3.1. Исследование процесса накопления биомассы клеток микроводорослей *C. vulgaris* в сточных водах разного состава.

3.2. Выбор способа гидролиза полисахаридов, входящих в состав биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

3.3. Трансформация ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в органические кислоты – мономеры для получения биоразлагаемых полимеров, и биополимеры – полигидроксиалканоаты.

3.4. Оценка научно-практического потенциала полученных в данной работе результатов.

3.5 Биотехнологический комплекс для накопления биомассы микроводорослей в процессе очистки сточных вод с ее последующей трансформацией в органические кислоты и ПГА.

Главу Результаты и обсуждение представленной к защите диссертации отличает безупречная логика, аккуратность и последовательность в планировании и проведении экспериментов, а также тщательное обсуждение и глубокий анализ полученных автором результатов.

В работе приведен огромный список литературы из 221 ссылки. При этом количество относительно новых ссылок (за последние 5 лет) в этом списке составляет порядка 45-50%, что свидетельствует о широком кругозоре автора и прекрасном знании им самых последних публикаций по теме диссертации.

По работе может быть сделан ряд замечаний:

1. В Главе 3.1 (стр. 66) в качестве поставленной задачи указывается увеличение скорости снижения ХПК. Однако в работе нигде не представлены экспериментальные данные по изменению концентрации ХПК во времени в данных системах. Вместо этого везде фигурирует средняя скорость снижения ХПК, определенная как средняя величина при культивировании в течение 8 дней.

2. На стр. 69 описаны эксперименты по применению гранул с клетками в качестве инокулянта. При этом нигде не указан объем гранул, вносимых в систему. Из представленных экспериментов можно рассчитать, что гранул вносится порядка 10% от объема модельных сточных вод, но при этом нигде не указано, сколько вносится ХПК вместе с гранулами в систему.

3. Глава 3.3. Все эксперименты проводятся на ферментализатах, что автоматически означает образование комплексной смеси, в которой могут присутствовать другие органические кислоты ЦТК, аминокислоты, а также нуклеиновые кислоты и полифосфаты. Однако автор не обсуждает, какое эффективное выделение целевых продуктов можно использовать при масштабировании процессов.

4. В Главе 3.1 изучается десорбция клеток из носителя, однако при этом в Главе 3.3 в аналогичной системе иммобилизации данной проблеме не уделено должного внимания. Следовательно, не ясно, участвуют ли в процессах синтеза свободные (вышедшие из носителя) клетки и какой вклад они вносят.

Вместе с тем нужно отметить, что автору практически удалось избежать опечаток и стилистических ошибок при оформлении диссертации, что бывает довольно редко и свидетельствует о пунктуальности и аккуратности автора. Небольшое замечание можно сделать по оформлению списка литературы: в частности, в ссылках 191 и 199 есть опечатки.

Однако высказанные соображения и замечания не имеют принципиального значения и носят чисто дискуссионный характер.

Диссертационная работа Мамедовой Фахрии Тахир Кызы прекрасно проиллюстрирована большим количеством рисунков и таблиц, в целом диссертация оставляет самое приятное впечатление.

Из работы видно, что автором выполнен очень большой объем исследований с использованием самых современных физико-химических методов.

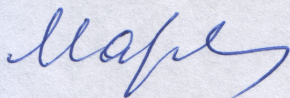
Заключение

Диссертация Мамедовой Ф.Т. на тему «Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам ее биокаталитической трансформации» является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком экспериментальном и теоретическом уровне, в которой предложены решения актуальных биотехнологических задач, связанных с накоплением биомассы микроводорослей, сопряженным с очисткой сельскохозяйственных и промышленных сточных вод, а также с разработкой научно-прикладных основ эффективного применения данного вида сырья в процессах биокаталитического получения органических кислот для органического синтеза биоразлагаемых полимеров. Основные научные положения и выводы, изложенные в диссертации, оригинальны, полученные результаты перспективны для дальнейшего практического использования. Автореферат полностью отражает содержание работы.

На основании вышеизложенного, считаю, что по своей новизне, объему результатов, научной и практической значимости диссертационная работа полностью удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года. Автор Мамедова Фахрия Тахир Кызы заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по

специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), химические науки.

ведущий научный сотрудник
доктор химических наук



Е.А. Марквичева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

тел. 8 (495) 336 06 00

email : lemark@ibch.ru



СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Мамедовой Фахрии Тахир Кызы на тему “Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chrorella vulgaris* и к процессам ее биокаталитической трансформации“, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук 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
Марквичева Елена Арнольдовна	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова вед. науч. сотр. Лаборатории полимеров для биологии	доктор химических наук	03.00.04 Биохимия	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tsoy A.M., Zaytseva-Zotova D.S., Edelweiss E.F., Bartkowiak A., Goergen J-L., Vodovozova E.L. and Markvicheva E.A. Microencapsulated multicellular tumor spheroids: preparation and use as a novel in vitro model for drug screening Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry 2010, 4 (3):243-250. 2. Суханова Т.В., Прудченко И.А., Ефремов Е.С., Угланова С.В., Филатова Л.Ю., Марквичева Е.А., Клячко Н.Л., Биомолекулы в коллоидных наноконтейнерах для доставки лекарств: включение и свойства дельта-сон индуцирующего пептида, Вестн. Моск. Ун-та, сер. 2 Химия, 2010, 51 (3): 209-214. 3. Zaytseva-Zotova D., Balysheva V., Tsoy A., Drozdova M., Akopova T., Vladimirov L., Chevalot I., Marc A., Goergen J.-L., Markvicheva E. Biocompatible Smart Microcapsules Based on Chitosan-Poly(Vinyl Alcohol) Copolymers for Cultivation of Animal Cells, Advanced Engineering Materials, 2011, 13 (12): B493-500. 4. Zaytseva-Zotova D., Udartseva O., Andreeva E., Bartkowiak A., Bezdetsnaya L.,Guillemin F., Goergen J.-L., Markvicheva E. Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool

					<p>to study the effects of photodynamic therapy, Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials, 2011, 97B (2) : 255–262.</p> <p>5. Borodina T., Grigoriev D., Markvicheva E., Mohwald H., Shchukin D. Vitamin E Microspheres Embedded Within a Biocompatible Film for Planar Delivery, Advanced Engineering Materials, 2011, 13 (3):B123–B130.</p> <p>6. Sukhanova T.V., Artyukhov A.A., Prudchenko I.A., Golunova A.C., Semenikhina M.A., Shtilman M.I., Markvicheva E.A., Entrapment and In Vitro Release of Delta-Sleep Inducing Peptide from Polymer Hydrogels Based on Modified Polyvinyl Alcohol, Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 2012, 6, 2: 149–155.</p> <p>7. Demina T., Zaytseva-Zotova D., Yablokov M., Gilman A., Akopova T., Markvicheva E., Zelenetskii A., DC Discharge Plasma Modification of Chitosan/Gelatin/PLLA Films: Surface Properties, Chemical Structure and Cell Affinity, Surface & Coatings Technology, 2012, 207: 508-516.</p> <p>8. Бальшева В.И., Белов С.Ю., Власова Н.Н., Капустина О.В., Селина О.Е., Иматдинов И.Р., Марквичева Е.А., Изучение иммунного ответа при иммунизации мышцей рекомбинантными плазмидами, включенными в биodeградируемые микрокапсулы, Биотехнология, 2013, 5 : 71-77.</p> <p>9. Sukhanova T.M., Artyukhov A.A., Gurevich Y.M., Semenikhina M.A., Prudchenko I.A., Shtilman M.I., Markvicheva E.A., Delta-sleep inducing peptide entrapment in the charged macroporous matrices, Mater Sci Eng C., 2014, 42: 461-465.</p> <p>10. Privalova A., Markvicheva E., Sevrin C., Drozdova M., Kottgen C., Gilbert B., Ortiz M., Grandfils Ch., Biodegradable polyester-based microcarriers with</p>
--	--	--	--	--	---

					<p>modified surface tailored for tissue engineering, J Biomedical Mater Research Part B, 2015, 103(3):939-48.</p> <p>11. Privalova A.M., Uglanova, S.V., Kuznetsova N. R., Klyachko N.L., Golovin Y. I., Korenkov V.V., Vodovozova E.L., Markvicheva E. A., Microencapsulated Multicellular Tumor Spheroids as a Tool to test Novel Anticancer Nanosized Drug Delivery Systems in Vitro, J Nanoscience Nanotechnology, 2015, 15(7) : 4806-4814.</p>
--	--	--	--	--	---

Ведущий научный сотрудник лаборатории полимеров для биологии
 Д.Х.Н.

Марк

Марквичева Елена Арнольдовна

Личную подпись
 УДОСТОВЕРЯЮ
 ЗАВ. КАБИНЕТОМ
 2015

Марквичева Е.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
 Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
 Тел. (495) 336-06-00
 e-mail: lemark@ibch.ru