



14.05.2015 № 15324/1-2171/379

УТВЕРЖДАЮ  
ВРИО Директора института, чл.-корр. РАН  
В.И. Бухтияров  
\_\_\_\_\_ 2015 г.



## ОТЗЫВ

Ведущей организации федерального государственного бюджетного учреждения науки Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН (ИК СО РАН) о диссертации **Мамедовой Фахрии Тахир Кызы на тему «Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и процессам ее биокаталитической трансформации»,**

Представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

**Актуальность темы исследования.** Исследования последних лет, направленные на изучение перспективных биотехнологических процессов получения целевых химических веществ из возобновляемой биомассы, являются несомненно актуальными. При разработке таких процессов важно не только учитывать возможность получения различных целевых продуктов из используемой биомассы, но и организовать производство с минимальной нагрузкой на окружающую среду. Поиски продуктивных видов биомассы для биотехнологической конверсии выдвигают в разряд перспективных источников фототрофные микроорганизмы. Клетки микроводорослей представляют собой источник углеводов, белков и липидов, которые могут быть подвергнуты дальнейшей биотехнологической трансформации в различные целевые продукты. Важным с научной и практической точек зрения является разработка и исследование новых биотехнологических процессов с их использованием в процессах очистки сточных вод и последующей трансформацией их возобновляемой биомассы в коммерчески значимые продукты. Ими являются

органические кислоты – молочная (МК), фумаровая (ФК), янтарная (ЯК), а также полимерных материалов, получаемых биотехнологическим путем, например, полигидроксиалканоатов (ПГА), используемых для производства полимерных изделий.

В связи с этим, сформулированная автором **цель исследования:** исследование 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, является чрезвычайно актуальной и своевременной с точки зрения биотехнологии (в том числе бионанотехнологии).

**Научная новизна исследования** заключается в том, что диссертантом разработан оригинальный способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов путем их иммобилизации в криогель ПВС, обеспечивающий продолжительное хранение клеток при сохранении у них пролиферативной функции на 90÷95 %. Показано, что этот подход позволяет увеличить скорость процессов очистки сточных вод и накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris* для ее 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, предложен подход к утилизации биомассы мицелиальных грибов рода *Rhizopus* с применением методов метаногенеза и быстрого пиролиза с получением, соответственно, метана и пиролизной нефти. Установлено присутствие длинноцепочечных нитрилсодержащих соединений в образцах пиролизной нефти, которые

можно рассматривать в качестве перспективных компонентов высокоэнтальпийного топлива. Впервые установлено, что для получения ПГА с использованием бактерий *C. necator* могут быть использованы гидролизаты биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

**Практическая значимость исследования.** Предложен оригинальный способ использования высококонцентрированного инокулята для ускоренного накопления биомассы клеток фототрофных микроорганизмов. Этот подход позволяет применять его для обработки сточных вод различного химического состава с целью значительного снижения уровня ХПК. Разработан оригинальный высокоэффективный биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes* для получения ЯК, позволяющий значительно расширить спектр возможных источников сырья (биомассы фототрофных микроорганизмов, макроводорослей, целлюлозосодержащих отходов) для получения ЯК. Полученные результаты позволяют говорить о разработке фундаментальных основ процесса получения широкого спектра ценных веществ из биомассы фототрофных микроорганизмов. В ходе работы разработаны основы процесса очистки сточных вод различного состава, и проведение трансформации ее гидролизатов в различные целевые продукты в виде природных полимеров (ПГА) или мономеров (МК, ФК, ЯК) для синтеза биоразлагаемых полимеров.

**Степень обоснованности и достоверности полученных результатов.** Диссертационная работа Мамедовой Фахрии Тахир Кызы. выполнена на современном высокотехнологичном уровне, в необходимом объеме. Полнота выполненных исследований, количество и качество материала позволяют не сомневаться в ее достоверности. Метод исследования отвечает современному уровню биотехнологии. Высокая степень доказательности установленных в работе фактов определяется использованием современного статистического анализа, адекватного целям и задачам исследования. Сформулированные в диссертации выводы

и научные положения основаны на непосредственных результатах проведенных исследований и подтверждены фактическим материалом. Конкретно и адекватно сформулированы цель работы и задачи исследования, положения выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы. Выбранные методики исследования современны, информативны, объем исследований достаточен для выполнения диссертации. Задачи, поставленные во введении, согласуются с заявленной целью исследования и полностью раскрыты в соответствующих выводах. То же касается и положений, выносимых на защиту.

Работа хорошо апробирована – в виде научных докладов на 8 научных форумах. По материалам диссертации выполнено достаточное количество публикаций - опубликованы 4 статьи в журналах из Перечня ВАК, 1 Патент РФ на изобретение и 9 тезисов на международных и российских конференциях.

**Оценка содержания диссертации и автореферата.** Диссертационная работа написана в традиционном стиле, оформлена с соблюдением принятых стандартов и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, трех глав собственных результатов, обсуждения полученных данных, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Работа содержит 176 страниц печатного текста, включая 50 рисунков, 36 таблиц, 221 ссылку.

Глава с обзором литературы насыщена современными публикациями отечественных и зарубежных ученых, читается легко и дает полное представление о важности и изученности проблемы.

В главе 2 приведены материалы и методы решения поставленных задач, в том числе определения состава компонентов биомассы, получения гидролизатов биомассы различными методами (кислотный, ферментативный), а также получения и анализа целевых веществ.

Выбранные методы адекватны для решения поставленных задач. Главы собственных результатов диссертации написаны в едином стиле, надлежащим образом иллюстрированы таблицами и рисунками.

В главе 3 автор представил результаты исследования в сопоставлении с литературными данными. В ходе работы было проведен скрининг штаммов с высокой удельной скоростью роста на сточных водах, на основе которого был выбран штамм *C. vulgaris* с высоким содержанием углеводов (50÷55 % сухого веса). Был разработан способ иммобилизации клеток микроводорослей, обеспечивающий сохранение способности к пролиферации клеток на  $95\pm 3\%$ , что безусловно является высоким показателем. сравнительный анализ эффективности различных способов предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, показал, что оптимальным, с точки зрения получения максимальных выходов ВС и глюкозы при гидролизе полисахаридов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, можно считать подход, сочетающий последовательно метод её механической деструкции в шаровой мельнице и метод её ферментативной обработки. Для исследования и оптимизации процессов получения МК и ФК из ферментолитатов биомассы *C. vulgaris* были использованы оригинальные биокатализаторы в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиальных грибов: *Rhizopus oryzae* F-814 – продуцент, *R. oryzae* F-1032 – продуцент ФК. Полученные результаты были в 142 раза лучше по показателям  $S_{МК\max}$  и  $Q_{МК}$ , чем в единственном известном из литературы аналогичном процессе. Для получения ЯК был разработан биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes*, показано, что при иммобилизации обеспечивается увеличение показателя длительности возможного эффективного использования продуцента как минимум в 19 раз, продуктивности процесса – в 1,2 раза, максимальной концентрации ЯК за 1 цикл – в 1,4 раза. Впервые установлено, что перспективной основой сред для

культивирования клеток *C. necator* с целью накопления в них ПГА является ферментолитат биомассы микроводорослей. При этом скорость накопления ПГА ( $405 \pm 12$  мг/л/сут) в установленных условиях в 4,6 и более раз превосходит известные из литературы данные, полученные при использовании для накопления ПГА разных гидролизатов и отходов производства.

Обсуждение полученных результатов читается очень легко, написано интересно и логично, с привлечением современных литературных источников, и демонстрирует научную зрелость автора, а также его большой личный опыт. Выводы логично вытекают из результатов исследования и в целом соответствуют поставленной цели и задачам. Автореферат диссертации в достаточной степени отражает основное содержание работы.

Автором лично выполнены исследования, проведена обработка полученных результатов и представление в форме докладов на международных и российских научных конференциях различного уровня.

**Рекомендации по использованию полученных результатов и выводов:** Результаты исследования представляют собой дополнительный материал для специалистов в области биотехнологии, а также для специалистов в области микробиологии и химической технологии. Полученные данные рекомендованы для широкого применения в лабораториях НИИ, изучающих и разрабатывающих биопроцессы получения целевых веществ на основе микроводорослей и микроорганизмов (Национального Исследовательского центра «Курчатовский институт», Институте катализа СО РАН, Институте биофизики СО РАН), а также для внедрения в образовательный процесс по направлению «биотехнология» в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, Новосибирском государственном университете и других ВУЗах.

Новизна и важность этого исследования несомненны, поскольку вызваны объективными причинами, например, отсутствием эффективных технологий переработки и утилизации сточных вод. Кроме того, широкий спектр получаемых продуктов (янтарная, фумаровая и другие кислоты) на сточных водах реально существующих производств делает представленную к защите работу особенно ценной. Стоит отметить, что выходы целевых веществ многократно превышают показатели аналогичных биотехнологических процессов, а ряд подходов к их биокаталитическому получению был применен впервые. Кроме того, показана возможность применения оригинального способа криоконсервации клеток микроводорослей путем включения в гель.

В целом, представленная работа производит впечатление законченного высокопрофессионального научного исследования. В ходе выполнения работы были получены новые данные, которые, несомненно, внесут вклад в развитие биотехнологии. Такого рода исследования весьма актуальны для современной науки, а результаты этой работы могут быть использованы для широкого спектра исследований в различных областях.

#### **Вопросы и замечания.**

Несмотря на то, что принципиальных замечаний к диссертационному исследованию Мамедовой Фахрии Тахир Кызы нет, при изучении работы возник ряд вопросов, требующих прояснения и дискуссии:

1. Обращает на себя внимание большое количество подходов, примененных для переработки биомассы микроводорослей в различные вещества. В ходе работы прочтения иногда возникают вопросы о необходимости получения более полной информации о различных процессах. В целом, структура диссертационной работы более подходит для докторской работы. Однако стоит отметить соответствие представленных выводов поставленным задачам, поэтому высказанное замечание не носит принципиальный характер.

Диссертационная работа является хорошим заделом для докторской диссертации.

2. После изучения работы возник ряд незначительных вопросов по полученным результатам. Например, в работе приводится информация лишь о данных по целевым веществам (фумаровой, янтарной кислотам и др.), при этом не отражен состав всех веществ, получаемых в ходе ферментации сахаров. Данная информация является необходимой для учета всех параметров процесса ферментации, а также последующего выделения целевых веществ.

В связи с этим прошу ответить на вопрос: «Планирует ли автор работы расширить данные об остальных продуктах биосинтеза, получаемых в ходе биоконверсии сахаров в целевые продукты, а также провести анализ сахаров, получаемых из биомассы при гидролизе?».

3. В разделе, посвященном сравнительной характеристике эффективности применения иммобилизации клеток в гелях для криоконсервации, приводится информация по ряду культур. Прошу ответить на следующий вопрос: «Применялся ли данный подход для криоконсервации культур, для которых было показано, что хранение при низких температурах не применимо?».

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Мамедовой Фахрии Тахир Кызы на тему «Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и процессам ее биокаталитической трансформации» является самостоятельным законченным научно-квалификационным трудом, выполненном на высоком методическом уровне, в котором содержится решение крупной научной проблемы переработки сточных вод в ценные продукты, что имеет большое практическое и научное значение.



Работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утв. постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842) ВАК Минобрнауки России, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв был рассмотрен и одобрен на заседании Отдела нетрадиционных каталитических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук (Протокол №65 от 12.05.2015 г.).

С.н.с. ИК СО РАН, к.б.н.

К.Н. Сорокина

Секретарь семинара  
Отдела нетрадиционных  
каталитических процессов,  
с.н.с., к.х.н.

Е.В. Пархомчук

Академик РАН, д.х.н,  
Зав. Отделом нетрадиционных  
каталитических процессов  
Научный руководитель ИК СО РАН

В.Н. Пармон

Личную подпись  
заверяю.

Зам. начальника отдела кадров  
14.05.2015



*К.Н. Сорокина, Е.В. Пархомчук, В.Н. Пармона*

О.Г. Колотовкина

**Сведения о ведущей организации по диссертации**

**Мамедовой Фахрии Тахир Кызы**

**на тему «Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella 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).**

полное наименование и сокращенное наименование

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук (ИК СО РАН)*

почтовый адрес, телефон (при наличии), адрес электронной почты (при наличии), адрес официального сайта в сети «Интернет» (при наличии)

*630090 г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 5, тел. +7 (383) 330-80-56, bic@catalysis.ru, http://www.catalysis.ru*

список основных публикаций сотрудников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций).

1. Шумный В.К., Колчанов Н.А., Сакович Г.В., Пармон В.Н., Вепрев С.Г., Нечипоренко Н.Н., Горячкова Т.Н., Брянская А.В., Будаева В.В., Железнов А.В., Железнова Н.Б., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Розанов А.С., Сорокина К.Н., Слынько Н.М., Яковлев В.А., Пельтек С.Е. Поиск возобновляемых источников целлюлозы для многоцелевого использования // Журнал генетики и селекции. 2010. Т. 14. № 3. С. 569-578.
2. Сорокина К.Н., Яковлев В.А., Пилигаев А.В., Кукушкин Р.Г., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А., Пармон В.Н. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики // Катализ в промышленности. 2012. № 2. С. 63-72.
3. Пилигаев А.В., Сорокина К.Н., Брянская А.В., Демидов Е.А., Кукушкин Р.Г., Колчанов Н.А., Пармон В.Н., Пельтек С.Е. Исследование биоразнообразия микроводорослей Западной Сибири для применения в процессах получения биотоплива третьего поколения // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С. 359-367.

4. Piligaev A.V., Sorokina K.N., Bryanskaya A.V., Demidov E.A., Kukushkin R.G., Kolchanov N.A., Parmon V.N., Pel'tek S.E. Research on the biodiversity of Western Siberia microalgae for third-generation biofuel production processes // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2013. Т. 3. № 6. С. 487-492.
5. Сорокина К.Н., Розанов А.С., Брянская А.В., Пельтек С.Е. Выделение и исследование свойств бактерий термальных источников Северного Прибайкалья, обладающих липолитической активностью // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4-1. С. 651-658.
6. Kovalenko G.A. , Perminova L.V. , Beklemishev A.B. , Tkachenko V.I. Study on Physicochemical Properties of Biocatalysts with Thermostable Lipase Activity and Final Products of Triglycerides' Interesterification // Applied Biochemistry and Microbiology. 2014. V.50. №7. P.21-33.
7. Самойлова Ю.В., Тулупов А.А., Сорокина К.Н. Современные подходы к разработке новых ферментов липаз и продуцентов на их основе // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2014. Т. 12. № 4. С. 77-84.
8. Maki-Arvela P., Simakova I.L., Salmi T., Murzin D. Production of Lactic Acid/Lactates from Biomass and Their Catalytic Transformations to Commodities // Chemical Reviews. 2014. V.114. №3. P.1909-1971.

Ученый секретарь ИК СО РАН  
 630090 г. Новосибирск,  
 проспект академика Лаврентьева,  
 Тел. +7 (383) 330-87-67  
 e-mail: science@catalysis.ru  
 к.х.н. ВЕДЯГИН Алексей Анатольевич



Личную подпись  
 заверяю.

Зам. начальника отдела кадров  
 14.05.2015



О.Г. Колотовкина