

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора технических наук Кригер Ольги Владимировны на диссертационную работу Сачавского Александра Александровича «Управляемое культивирование сообществ метанооксиляющих микроорганизмов», представленную на соискание учёной степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

**Актуальность работы.** Поиск новых технологий получения кормового белка и биоразлагаемых полимеров остаётся одним из приоритетных направлений современной биотехнологии, что продиктовано как растущим дефицитом традиционных источников протеина, так и необходимостью сокращения углеродного следа промышленных производств. Метанотрофные микроорганизмы представляют собой перспективную платформу для биоконверсии метаносодержащего сырья в продукты с добавленной стоимостью. Данные бактерии способны расти на метане в качестве единственного источника углерода и при этом синтезировать в значительных количествах широкий спектр ценных соединений, включая белок и полигидроксibuтират. Однако эффективная реализация этих возможностей в промышленном масштабе сдерживается низкой удельной скоростью роста чистых культур, их уязвимостью к контаминации, а также высокой чувствительностью процесса к составу среды и газовой фазы. Таким образом, формирование экономически конкурентоспособной технологии нуждается в разработке управляемых подходов к повышению продуктивности и устойчивости процесса культивирования метанотрофов.

Ключевую роль в решении указанной проблемы играют метанооксиляющие сообщества, включающие метанотрофов и их неметанотрофных спутников. Межвидовые синтрофные взаимодействия могут повышать продуктивность культивирования за счёт стимулирования метанооксиляющей активности метанотрофов, потребления ингибирующего воздействия токсичных интермедиатов окисления метана, а также повышают

стабильность длительного культивирования. При этом перенос акцента с природных консорциумов на синтетические сообщества заданного состава позволяет целенаправленно культивировать композиции, обладающие повышенной продуктивностью и содержанием целевых соединений. Таким образом, актуальной становится научно-техническая задача разработки методов конструирования продуктивных метанотрофных сообществ и оптимизации их управляемого культивирования для масштабируемого получения биомассы метанотрофных сообществ. Именно на решении данной задачи фокусируется диссертационная работа Сачавского А.А. Соискатель предлагает системный подход, включающий этапы от выделения ключевых микроорганизмов до создания стабильных синтетических консорциумов и их культивирования в условиях, приближенных к промышленным. Далее в отзыве представлен детальный анализ содержания работы, в котором изложены предложенные автором подходы.

**Анализ содержания диссертационной работы.** Диссертационная работа Сачавского А.А. изложена на 224 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературных источников, включающего 353 наименования, 43 таблиц, 23 рисунков, 4 приложений.

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи, последовательное решение которых обеспечило её достижение. Чётко обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, изложены методология и методы исследования, сформулированы три положения, выносимые на защиту. Приведены сведения о степени достоверности, апробации результатов на конференциях различного уровня и публикациях автора, а также данные о личном вкладе соискателя и соответствии диссертации паспорту научной специальности.

**В первой главе** представлен аналитический обзор литературы, охватывающий ключевые аспекты физиологии и метаболизма метанооксиляющих бактерий, включая детальное описание путей окисления и

ассимиляции метана, а также классификацию метанотрофов. Значительное внимание уделено обзору биотехнологического потенциала этой группы микроорганизмов как продуцентов белка, полигидроксиалканоатов, экзополисахаридов, липидов и ряда других ценных соединений. Подробно проанализированы литературные данные о влиянии состава питательной среды и газовой фазы на рост и продуктивность чистых и смешанных культур метанотрофов. Отдельный раздел посвящён рассмотрению метанотрофных сообществ, включая природные и синтетические консорциумы, роли неметанотрофных спутников и методам их получения. Глава завершается обоснованием необходимости разработки системного подхода к конструированию высокопродуктивных синтетических сообществ.

**Во второй главе** изложены объекты, материалы и методы исследования. Описаны процедуры отбора природных образцов, получения накопительных культур, выделения чистых культур метанотрофных и неметанотрофных микроорганизмов, их идентификации методом секвенирования гена 16S рРНК. Детально представлены методики определения ростовых характеристик, конструирования бинарных и тройных синтетических сообществ, оптимизации состава питательных сред с применением однофакторных экспериментов и центрального композиционного плана. Приведено описание условий периодического и непрерывного культивирования в стерильных и нестерильных режимах, включая использование технического метана. Изложены аналитические методы определения состава биомассы, а также методы исследования биосинтеза и свойств наночастиц серебра.

**Третья глава** диссертации посвящена изложению и обсуждению основных экспериментальных результатов, полученных автором. Представлены данные по получению и составу быстрорастущих накопительных метанотрофных сообществ, выделению из них чистых культур метаноокисляющих и неметанотрофных микроорганизмов. Определены базовые ростовые характеристики метанотрофных изолятов и коллекционных

штаммов. Центральное место занимает описание разработанного метода конструирования синтетических сообществ на основе количественной оценки парных взаимодействий «метанотроф–спутник» и создания на этой основе трёхкомпонентных сообществ, продемонстрировавших повышенную продуктивность. Подробно изложены результаты оптимизации питательных сред и газовой фазы для обоих сообществ, позволившей существенно повысить удельную скорость роста, накопление белка и полигидроксibuтирата. Приведены результаты непрерывного культивирования созданных сообществ в стерильных и нестерильных условиях с использованием чистого и технического метана, включая метагеномный анализ стабильности состава разработанных композиций. Завершают главу данные по исследованию внеклеточного биосинтеза наночастиц серебра чистыми метанотрофными культурами и синтетическими сообществами, включая характеристику морфологии и антимикробной активности наноструктур.

**В четвёртой главе** на основе совокупности полученных экспериментальных данных разработаны принципиальные технологические схемы получения целевых продуктов. Для синтетического сообщества, ориентированного на накопление белка, обоснована одностадийная нестерильная технология производства высокобелковой биомассы, включающая непрерывное культивирование на техническом метане, сепарирование, промывку биомассы, инактивацию острым паром и распылительную сушку. Для сообщества, предназначенного для синтеза полигидроксibuтирата, предложена двухстадийная схема, разделяющая фазы стерильного накопления биомассы и нестерильного накопления целевого полимера с последующей сепарацией и лиофильной сушкой. Проведён предварительный технико-экономический анализ обеих схем, включающий расчёт эффективного фонда рабочего времени, подбор основного оборудования, оценку капитальных и эксплуатационных затрат и калькуляцию себестоимости готовой продукции. Показано конкурентное

преимущество синтетического сообщества, направленного на получение высокобелковой биомассы, по сравнению с промышленным аналогом, а также обозначены перспективы снижения себестоимости для разработанной композиции при получении биомассы с высоким содержанием полигидроксибутирата при масштабировании и внедрении ряда технологических решений.

**В заключении** подведены итоги выполненного исследования, сформулированы **выводы** и обозначены перспективы дальнейшего развития темы диссертационной работы.

**Приложения** содержат документы, подтверждающие депонирование штамма *Methylococcus capsulatus* KS-24 в Коллекции UNIQEM и практическое использование результатов диссертации.

**Соответствие автореферата содержанию диссертации.** Структура и содержание диссертации соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени кандидата технических наук. Содержание автореферата и публикаций достаточно полно отражает содержание диссертационной работы.

**Степень обоснованности и достоверности основных научных положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в работе, обеспечена сочетанием детального теоретического анализа с большим массивом собственных экспериментальных данных. Последние получены с использованием современного биотехнологического оборудования, стандартных аналитических методов определения состава микробной биомассы, а также молекулярно-генетических методов, включая секвенирование гена 16S рРНК и высокопроизводительное секвенирование ампликонов. При обработке результатов применены общепринятые подходы к планированию эксперимента и статистическому анализу данных. Обоснованность выводов дополнительно подтверждается длительными экспериментами по непрерывному культивированию синтетических

сообществ, включая многодневные циклы с применением как стерильных, так и нестерильных условий при варьировании состава минеральной среды и газовой фазы и анализом стабильности разработанных композиций. Совокупность перечисленных факторов обеспечивает высокую степень достоверности и воспроизводимости полученных результатов.

Личный вклад соискателя не вызывает сомнений и заключается в самостоятельном анализе литературных источников по теме диссертации, формулировании цели и задач исследования, разработке методологических подходов, непосредственном выполнении экспериментальной части работы, статистической обработке и обобщении полученных данных, а также в подготовке основных публикаций и апробации результатов на научных конференциях.

**Публикации результатов исследований.** Научные положения и результаты диссертационной работы в достаточной полноте отражены в публикациях автора в рецензируемых научных журналах и сборниках трудов международных и всероссийских конференций. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 2 статьи в рецензируемых научных изданиях перечня ВАК Минобрнауки России, 1 статья в издании, входящем в международные реферативные базы данных Scopus и Web of Science, 4 статьи в журналах, входящих в базу данных РИНЦ, 9 публикаций в сборниках международных и всероссийских научных конференций.

**Научная новизна полученных результатов, положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется следующим:**

1. Выделен, идентифицирован и депонирован в Коллекции UNIQEM новый штамм метанооксиляющей бактерии *Methylococcus capsulatus* KS 24, который характеризуется высокой для метанотрофов удельной скоростью роста и широким температурным оптимумом, что делает его перспективным продуцентом богатой белком биомассы;

2. Разработан и экспериментально подтверждён оригинальный метод направленного составления синтетических метанотрофных сообществ, основанный на количественном скрининге парных взаимодействий метаноокисляющих бактерий с гетеротрофными спутниками. Показано, что такой подход позволяет целенаправленно формировать устойчивые бактериальные композиции, превосходящие по скорости роста и выходу биомассы как природные накопительные культуры, так и исходные монокультуры;

3. Выявлены ключевые компоненты питательной среды и параметры газовой фазы (концентрации  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , соотношение и концентрация источников азота, величина C/N, доля  $\text{CH}_4$  в газовой смеси), а состав разработанной среды даёт возможность достигать наиболее повышенной продуктивности или накопления целевых веществ – содержание сырого протеина может быть повышено до 76,5 % от сухой массы, а полигидроксibuтирата – до 39,7 % в зависимости от выбранного сообщества;

4. Экспериментально доказано, что созданные синтетические сообщества способны к длительному непрерывному нестерильному культивированию на техническом метане при сохранении стабильности состава и высокой доли времени работы в заданных технологических параметрах, что обосновывает возможность снижения капитальных затрат за счёт отказа от строгих асептических условий;

5. Впервые обнаружена и охарактеризована способность чистых культур *M. capsulatus* и *M. trichosporium*, а также построенных на их основе синтетических сообществ к внеклеточному биосинтезу наночастиц серебра в условиях фотоиндукции. Показано, что интенсивность образования и антимикробная активность получаемых наночастиц зависят от метаболического состояния клеток-продуцентов, что открывает перспективу применения данного феномена как быстрого индикатора физиологической активности метанотрофов при отработке биотехнологических процессов.

Таким образом, представленные в работе новые научные данные расширяют существующие представления о возможностях направленного конструирования и культивирования синтетических метанотрофных консорциумов.

**Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы.** С практической точки зрения, разработанные подходы и полученные результаты могут быть непосредственно использованы при проектировании биотехнологических производств, основанных на переработке метаносодержащего сырья.

Обобщены современные сведения о метаболизме метаноокисляющих бактерий и их взаимодействии с гетеротрофными спутниками; выявленные закономерности влияния состава среды на распределение метаболических потоков дополняют фундаментальные знания о физиологии метанотрофов.

Разработан метод направленного конструирования синтетических метанотрофных консорциумов, основанный на количественной оценке парных взаимодействий, который позволяет целенаправленно формировать устойчивые и высокопродуктивные ассоциации.

Для сообщества на основе *M. capsulatus* KS-24 подобраны условия, обеспечивающие содержание сырого протеина в диапазоне от 72 до 76 % и среднюю продуктивность 2,61 кг/(м<sup>3</sup>·ч) в нестерильных условиях на техническом метане; для сообщества на базе *M. trichosporium* разработана двухстадийная схема, обеспечивающая накопление полигидроксibuтирата до 38,1 % от абсолютно сухого вещества.

Доказана возможность длительного непрерывного нестерильного культивирования созданных сообществ; доля целевых микроорганизмов сохраняется на уровне не менее 79 %, продуктивность сопоставима со стерильным процессом, что снижает капитальные и эксплуатационные затраты.

Технико-экономический анализ показал, что себестоимость биомассы синтетического сообщества МС5 при годовом выпуске 10000 т составляет

194,4 руб./кг, что на 10,5 % ниже, чем у промышленного аналога; для пилотного масштаба 1000 т в год себестоимость биомассы сообщества МС7 оценивается в 1630 руб./кг, что служит ориентиром для дальнейшей оптимизации технологии культивирования и внедрения.

Выявленная способность метанотрофов к внеклеточному биосинтезу наночастиц серебра (5-20 нм) с антимикробной активностью в отношении грамотрицательных патогенов расширяет представления о биотехнологическом потенциале этой группы и открывает возможность экспресс-оценки физиологического состояния культур.

Результаты диссертационной работы внедрены в производственную деятельность, что подтверждено соответствующими актами; разработанный алгоритм создания синтетических метанотрофных сообществ защищён в качестве результата интеллектуальной деятельности в режиме ноу-хау; утверждённый лабораторный регламент на процесс получения бактериальной биомассы подтверждает готовность результатов к практическому использованию и масштабированию.

### **Замечания и вопросы по диссертационной работе**

1. Требуется пояснение автора относительно термина «быстрорастущие метанотрофные сообщества». Какая удельная скорость роста для них характерна?
2. В таблице 3, стр. 89 указывается температурный режим культивирования в диапазоне от 37 до 40 °С или от 27 до 30°С. Чем обоснован выбор данных температурных диапазонов при культивировании накопительных культур и как он поддерживался в процессе культивирования?
3. На рисунках 3, 15, 21 следовало указать вид микроскопии и увеличение представленных изображений.

4. Таблица 8 – Продуктивность трехсоставных сообществ. Как проводилась оценка роста в сравнении с чистой культурой? Что характеризует данный показатель?
5. Каковы, по мнению автора, перспективы использования метанотрофных микроорганизмов в синтезе наносеребра в промышленных масштабах?
6. Как влияет режимы культивирования метанотрофных сообществ и их видовой состав на биосинтез целевого продукта?

Указанные замечания и рекомендации не являются принципиальными. В целом работа выполнена на высоком профессиональном уровне с применением современных методов исследования.

**Заключение о соответствии диссертации требованиям «Положения о присуждении учёных степеней».** Диссертационная работа Сачавского Александра Александровича на тему «Управляемое культивирование сообществ метаноокисляющих микроорганизмов» является завершённой научно-исследовательской работой, в которой изложено новое научно-обоснованное технологическое решение задачи повышения продуктивности и стабильности процессов биоконверсии метана в ценные продукты с добавленной стоимостью, имеющее существенное значение для развития биотехнологии.

По своей актуальности, объёму выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости представленная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология, а её автор, Сачавский Александр Александрович, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата технических наук по указанной специальности.

**Официальный оппонент:** доктор технических наук (05.18.04 – Технология мясных молочных и рыбных продуктов и холодильных производств), доцент, профессор факультета биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО».

Кригер Ольга Владимировна

5.06.2016

Адрес места работы: 197101, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д. 49, лит. А

Контактные данные: тел.: +7(923)498-45-64,

e-mail: [ovkriger@itmo.ru](mailto:ovkriger@itmo.ru), [olgakrieger58@mail.ru](mailto:olgakrieger58@mail.ru)

Подпись Кригер О.В. удостоверено  
Менеджером ИТМО  
Дорога



Вход. № 05-9019  
« 09 » 06 2016 г.  
подпись Иван