

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Дбар Сарии Джоновны на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Создание полифункциональной пищевой добавки на основе *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*» по специальностям 1.5.11. – микробиология; 1.5.6. – биотехнология**

Начиная с работ великого ученого И.И. Мечникова, бесспорно установлена роль микробиоты кишечника для жизненных функций человека. Нормальная микробиота обеспечивает колонизационную резистентность - защиту слизистой кишечника от болезнетворных бактерий, подавляя патогенные микроорганизмы и предупреждая инфицирование организма. Польза для здоровья от этих микроорганизмов может проявляться либо непосредственно за счет взаимодействия живых микроорганизмов (пробиотический эффект), либо косвенно за счет приема внутрь микробных метаболитов, синтезированных во время ферментации (биоактивный эффект). Особое внимание ученых привлекают нетоксичные антибактериальные вещества природного происхождения (Ansari, Liong, 2015). Так, известно, что штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, которым присвоен статус “GRAS” (Generally Recognized As Safe), что определяет их как абсолютно безопасные для здоровья человека и животных, способны к синтезу бактериоцинов (Rattanachaikunsorn, Phumkhachorn, 2010). Описание новых штаммов-продуцентов бактериоцинов с широким спектром действия, позволит использовать их в качестве потенциальной альтернативы антибиотикам в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, садоводстве и других областях (Cotter et al., 2013).

Представленная Дбар С.Д. диссертационная работа значительно расширяет имеющиеся к настоящему моменту сведения по биохимическому разнообразию метаболитов молочнокислых бактерий - лактококков и в понимание особенностей их функционирования в микробиоте человека, а также их роли во взаимодействии между кишечником, микробиомом и мозгом, особенностям регуляции на нервном, гормональном и иммунологическом уровнях. Эта работа также имеет явно выраженную прикладную направленность в ряде решения биотехнологических задач, в частности отбора перспективных штаммов – продуцентов пищевых биодобавок и разработки технологий получения полифункциональных продуктов на их основе.

**Целью работы:** являлось создание полифункциональной пищевой добавки на основе отобранных ранее штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

В задачи входило отобрать наиболее эффективные коллекционные пробиотические штаммы с антимикробными свойствами и оценить способность к синтезу антимикробных метаболитов и нейромедиаторов в динамике роста. Исследовать влияние аминокислот на

рост, антимикробную активность и синтез нейромедиаторов у штаммов, а также способность к образованию короткоцепочечных жирных кислот. Для создания образца пищевой добавки автором также были изучены адгезионные свойства штаммов, на основе наиболее эффективного пробиотического штамма *L. lactis* subsp. *lactis* получен лабораторный образец пищевой добавки, который апробирован в модельных опытах на крысах препубертатного периода.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Существенная новизна проведенных диссертантом исследований не вызывает сомнений, и имеет не только прикладную, но и фундаментальную значимость с точки зрения понимания механизмов функционирования полезной микробиоты кишечника и ее доминирующей роли во взаимодействии системы «микробиота-кишечник-мозг». Впервые автором показано, что штаммы подвида *L. lactis* subsp. *lactis* способны к синтезу антимикробных метаболитов широкого спектра действия, подавляющих рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей и грибов, что является малоизвестным и особо ценным свойством для лактококков. Показано, что усиление антимикробной активности возможно путем внесения в среду культивирования ряда аминокислот, являющихся структурными компонентами бактериоцинов. Впервые доказана способность штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* к синтезу катехоламинов и предшественника серотонина (5-НТР), что создает возможность использования их в качестве потенциальной антидепрессантной мишени при различных заболеваниях, связанных с центральной нервной системой. Автором впервые показано влияние аминокислот на синтез биогенных аминов, их предшественников и продуктов метаболизма, что позволяет установить возможный вклад штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* в ось «микробиота-кишечник-мозг».

Практическая значимость работы определяется тем, что на основании установленных пробиотических показателей трех штаммов лактококков: уровня ингибиторной активности на тест-культуры, синтеза нейромедиаторов, короткоцепочечных жирных кислот и адгезионной способности отобран наиболее перспективный природный штамм 194 как основа полифункциональной пищевой добавки. Создан лабораторный образец полифункциональной пищевой добавки, подобраны оптимальные условия его хранения, изучены его биотехнологические показатели. В модельных опытах оценено влияние *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 на двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности у крыс препубертатного периода, получен протокол испытаний и акт апробации применения образца функциональной добавки. Разработанные рекомендации по биотехнологическому процессу создания

пищевой добавки на основе *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 позволяют создать как про-, так и метабитик полифункционального назначения.

### **Методология и методы исследований**

В работе продемонстрированы возможности современных микробиологических, биохимических, химических и биотехнологических методов. Результаты исследований очень подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики. Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу.

Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических фундаментальных вопросов классической микробиологии и биохимии микроорганизмов, а также прикладных биотехнологических задач по поиску продуцентов биологически активных соединений и эффективных подходов к получению пищевых добавок нового поколения. Возможность использования антимикробного потенциала лактококков рассматривается как перспективный источник альтернативы применяемым в клинике антибиотикам и имеет как свои преимущества за счёт их уникальных свойств и регуляторных функций для организма - хозяина.

Структура диссертационной работы изложена на 166 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов, рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, состоящего из 142 зарубежных источников и 61 отечественных, приложений, включающих акт апробации и протокол испытаний. Работа проиллюстрирована 60 рисунками и 7 таблицами. В **главе 1** приводится детальный обзор, касающийся характеристики молочнокислых бактерий, продуктов их метаболизма, в том числе подробное описание синтезируемых ими антимикробных бактериоцинов, аминокислот, жирных кислот, а также других предшественников нейромедиаторной активности в первой части обзора. Во второй части обзора затронуты вопросы, касающиеся функциональной роли лактококков и продуктов их метаболизма в механизмах регуляции системы коммуникаций между микробиотой кишечника и мозгом, выделенных в ось микробиота – кишечник – мозг, роли пробиотических добавок и их классификации, в зависимости от механизмов действия на организм. Особое внимание уделяется описанию существующих на фармацевтическом рынке БАДам на основе пробиотических культур и способам их хранения.

В **главе 2** представлена исчерпывающая информация по объектам и материалам исследования, а также всех используемых автором в диссертационной работе методик,

включающих современные микробиологические, цитологические, токсикологические методы, а также обширный блок биохимических и химических исследований.

**Глава 3** разделена диссертантом на ряд подглав (**3.1 – 3.6**), согласно поставленным ранее задачам, и прекрасно иллюстрирована - во всех подглавах в качестве подтверждения имеется подробный материал, представленный в виде графиков и таблиц с результатами, полученными соискателем. **В подглаве 3.1** автором рассматриваются вопросы скрининга антимикробной активности и оценки потенциала продукции бактериоцинов штаммами *L. lactis* subsp. *lactis* в динамике их роста в ферментационной среде. Штаммы 194, F-116 и F-119 обладают широким спектром антимикробного действия, ингибируя рост грамположительных, грамотрицательных бактерий и микромицетов. Синтез бактериоцинов достигает максимума своей активности у штамма 194 приходится на 9 ч культивирования и соответствует экспоненциальной фазе роста, а у штаммов F-116 и F-119 приходится на 15 и 18 ч культивирования. Дбар С.Д. установлено, что штамм 194 не требует добавления в среду дополнительных компонентов, так как его активность без аминокислот составила 3100 МЕ/мл по низину. Штаммы F-116 и F-119 повысили активность при добавлении изолейцина и аланина на 45% и 33% соответственно (2400 и 2625 МЕ/мл по низину).

**Подглава 3.2** посвящена исследованию нейромедиаторной активности и влияние аминокислот на синтез нейроактивных соединений штаммами лактококков. Установлено, что исследуемые штаммы лактококков способны как к внутри-, так и внеклеточной продукции нейромедиаторов на разных этапах роста: так, штаммы 194, F-116 и F-119 внутри- и внеклеточно за 9 часов культивирования повышали концентрацию 5-НТР - предшественника серотонина, а за 24 ч культивирования синтезировали катехоламины - адреналин и дофамин. **Подглава 3.3** включает результаты анализа состава короткоцепочечных и молочной кислот, синтезируемых лактококками. Как показали результаты ГЖХ, количество уксусной, пропионовой, изомасляной, масляной, изовалериановой кислот в культуральной жидкости всех штаммов лактококков увеличивалось в экспоненциальной фазе роста, а длинноцепочечных жирных кислот (C5 - C7) уменьшалось. Выявлено, что суточные культуры исследуемых штаммов при добавлении в среду аминокислот как предшественников нейромедиаторов в разной степени (как вне-, так и в клетке) образуют гомовалиновую кислоту, серотонин и норадреналин. У штамма F-116 серин и глутаминовая кислота стимулировали образование гомовалиновой кислоты (996,93 пикомоль/мл) и серотонина (838,00 пикомоль/мл) соответственно. У штамма 194 триптофан наиболее эффективно стимулировал образование норадrenalина (528,15 пикомоль/мл). **Подглава 3.5.** в качестве основополагающих включает результаты биотоксичности синтезируемых метаболитов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и оценку

жизнеспособности штамма на носителе – бетоните и с добавлением различных криопротекторов. Показана способность штаммов лактококков к формированию биопленок на абиотических поверхностях (адгезионные показатели), по результатам исследования лучшим был *L. lactis* subsp. 128 *lactis* штамм 194. Разработана схема лиофилизации с использованием различных защитных сред. Впервые проведены эксперименты по использованию бентонита в качестве криопротектора для лиофилизации штамма 194. Оценена его эффективность по выживаемости до/после лиофилизации и после 1 года хранения при сохранении биотехнологических показателей (скорость образования молочного сгустка, антимикробная активность).

**Подглава 3.6** является одной из ключевых результатов этой работы и посвящена изучению двигательной активности, ориентировочно-исследовательского поведения и уровня тревожности крыс под влиянием культуральной жидкости *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194. Автором показано, что пероральное введение нелинейным белым крысам, полученной биологически активной пищевой добавки параллельно с водой и обратно, и последующее проведение поведенческих тестов показали существенные результаты по латентному периоду, суммарному количеству стоек и актам груминга. Крысы более склонны к выживанию, у них повышена ориентировочно-исследовательская активность и понижена тревожность, из чего следует, что выбранная пробиотическая культура способна оказывать существенное анксиолитическое воздействие. Автором в диссертационной работе представлено «**Заключение**», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 работ, среди них 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова.

Принципиальных замечаний к диссертации не имеется, однако необходимо отметить ряд вопросов, возникших по ходу прочтения текста диссертации:

1. Стр. 54 в описании методики экстракции не указано, является ли данная схема разработкой автора или использовались ранее уже полученные схемы экстракции других исследователей? Что автор подразумевает под «степенью активности» используя метод диффузии в агар и каким образом проводился пересчет на концентрацию целевого вещества?

2. На Стр. 68 автор некорректно пишет, что «Известно, что микромицеты - *A. niger* INA 00760 и *C. albicans* INA 00763 выделяют токсины, являются причиной

плесневения продуктов питания, в частности, колбас, хлебобулочных изделий, фруктов, овощей, и, как известно, дрожжи *C. albicans* INA 00763 – возбудители кандидозов у людей и животных». Поскольку в тексте указаны коллекционные номера тест-культур с акронимом коллекции продуцентов ФГБНУ НИИНА указанные штаммы не являются токсинобразующими грибами, вызывающим плесневение продуктов, а коллекционными тест-культурами условно-патогенных микроорганизмов.

3. Подтверждалось ли какими-либо химическими методами наличие комплекса бактериоцинов в концентратах у штаммов? Если да, то изменялся ли компонентный состав и количество разных бактериоцинов в зависимости от добавления различных аминокислот и по какому принципу отбирались для опытов разные аминокислоты для добавления в среду?

Вышесказанное не уменьшает научной ценности работы, диссертация Дбар С.Д. отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11. – микробиология; 1.5.6. – биотехнология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Дбар Сария Джоновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. – микробиология; 1.5.6. – биотехнология (по биологическим наукам).

**Официальный оппонент:**

доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе», заместитель директора по научной работе, отдел микробиологии, лаборатория таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов, заведующая лабораторией

01.02.2024

Садыкова В. С.

**Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:** 03.02.12 – Микология; 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**Контактные данные:** тел. +7(499) 255-20 -13 e-mail: [sadykova](mailto:sadykova)

Адрес организации: 119021, Москва,

ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Отзыв Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА», к.х.н.

О.В. Кисиль