

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Климко Алёны Игоревны на тему: «Адаптация пробиотической молочнокислой бактерии *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях» по специальностям: 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Предметом исследования диссертационной работы Климко А.И. являются механизмы адаптации молочнокислых бактерий *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях, а также их пробиотические свойства.

Актуальность темы диссертации не вызывает сомнений, поскольку молочнокислые бактерии (МКБ) при их высочайшей биотехнологической значимости характеризуются высокой скоростью гибели в различных стрессовых условиях, особенно – в присутствии кислорода. При этом именно рост в присутствии кислорода повышает их стрессоустойчивость и урожай биомассы.

В связи с этим механизмы адаптации МКБ к аэробному росту требуют всестороннего изучения, что актуально как для биотехнологии, так и для понимания биологии этих бактерий.

Научная новизна работы заключается в раскрытии механизмов адаптации *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях. На основе протеомного анализа выявлены некоторые молекулярные механизмы такой адаптации – с участием пиридоксин-5'-фосфат-оксидазоподобного белка, шаперонина GroES, универсального стрессового белка USP и ряда других. Впервые показано повышение уровня ферментов синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов при аэробном росте у МКБ. Также впервые была измерена активность электрон-транспортной цепи на препаратах мембран МКБ, при этом продемонстрирована способность менахинона переносить электроны от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd*. Впервые были сконструированы праймеры для поиска ключевых генов

антиоксидантной защиты - кодирующих супероксиддисмутазу, каталазу, гемовую пероксидазу и пероксиредоксин, и с их помощью, а также путём измерения специфических активностей, определено наличие этих ферментов в клетках МКБ.

Практическое значение рассматриваемой работы заключается в расшифровке механизмов адаптации МКБ к условиям аэробного роста, что открывает пути как к лучшему пониманию механизмов устойчивости МКБ в условиях окислительного стресса, так и на этой основе - к повышению эффективности биотехнологий, использующих МКБ. Аэробное выращивание *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 и других МКБ позволит повысить их устойчивость к окислительным стрессам, способность к хранению выращенных культур, а аэробное выращивание в присутствии гемина и менахиона позволит существенно повысить выход биомассы МКБ.

Диссертационная работа имеет традиционную структуру по ГОСТ Р 7.0.11—2011, изложена на 182 страницах, содержит 15 рисунков, 19 таблиц и 1 приложение. Список литературы включает 308 источников, из них 302 на иностранных языках.

Литературный обзор состоит из пяти разделов, рассматривающих таксономические, цитологические, биохимические, технологические и функционально-медицинские (пробиотические и антиоксидантные) характеристики МКБ. Особое внимание обращено на ключевые свойства их метаболизма, выживаемость в условиях окислительного стресса, отношение к кислороду и его активным формам, особенностям углеродного и энергетического метаболизма МКБ при росте в аэробных условиях.

В главе 3, «Материалы и методы», подробно описаны использованные автором подходы и методики, в соответствии с принципом, чтобы любой исследователь при необходимости смог повторить, воспроизвести эти исследования. Особо стоит подчеркнуть, что перед статистической обработкой данные были проверены на их нормальность, подчинение закону нормального распределения.

Глава 4 «Результаты и обсуждение» содержит 6 разделов: пробиотические свойства МКБ, антимикробная активность МКБ в отношении условно-патогенных микроорганизмов, ингибирование автоокисления аскорбиновой кислоты, гены антиоксидантной защиты в геномах лактобацилл, обнаруженные с помощью вырожденных ПЦР-праймеров, сконструированных автором, активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты в клетках исследуемых МКБ, влияния аэробных и дыхательных условий культивирования на рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

Все представленные экспериментальные данные хорошо описаны, из них сделаны адекватные выводы.

Суммируя вышеотмеченное, можно заключить, что работа Клишко А.И. выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением современных методов исследования, адекватно подобранных и примененных в соответствии с поставленными задачами, все выводы автора, как правило, подкреплены подробным описанием собственных экспериментов. Достоверность результатов подтверждена статистически и не вызывает сомнения. Достоверность полученных результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах, а также их представлением на нескольких международных конференциях.

Положения, выносимые на защиту (за исключение одного), выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы.

Автореферат диссертации, изложенный на 26 страницах, адекватно отражает содержание и выводы диссертационной работы. Диссертационная работа и автореферат изложены доходчиво, грамотно и аккуратно оформлены.

К сожалению, к работе есть замечания.

Три замечания общего, концептуального характера.

Сформулированная цель работы (с. 4 автореферата, «поиск штамма МКБ с выраженными пробиотическими свойствами, а также с высокой степенью адаптации к присутствию кислорода») не отражает всей сути работы, является, скорее, одной из её первых задач.

Положение 1, выносимое на защиту, на мой взгляд, только «с натяжкой» может быть названо таковым, т.к. гетерогенность любой коллекции бактерий по ряду признаков является давно установленным фактом, и то же относится к штаммоспецифичности. Лучше бы это положение было описано как необходимый начальный этап работы.

То, что автор назвала «пробиотическими свойствами» (адгезия, способность к образованию биоплёнок, антимикробная и антиоксидантная активности) является, скорее, предпосылками этих свойств, т.к. по определению и по сути единственным критерием пробиотических свойств организма является принесение пользы организму-хозяину, чего в диссертации проверено не было.

В тексте содержится некоторое количество опечаток и стилистических ошибок, в некоторых случаях сокращения родовых названий бактерий на латыни содержат две буквы (*Lp. plantarum*, *Lb. acidophilus*), тогда как допускается лишь одна (*L. plantarum*, *L. acidophilus*).

Из литературного обзора не ясно применяется ли аэробное культивирование МКБ в биотехнологии или оно пока на стадии разработки.

Несколько замечаний по методической части: не указано в каком виде вносились добавки (гемин, менахинон) и условия их стерилизации; в разделе масс-спектрометрического анализа встречаются повторы; желательно было указать концентрации белка для каждой фракции в таблице № 13 по измерению специфической активности ферментов; на графике роста культуры в статичных и аэробных условиях (рисунок 14) отсутствуют стандартные отклонения (или экспериментальный разброс данных).

Заключение

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует

специальностям 1.5.11. «Микробиология» и 1.5.6. «Биотехнология», а также критериям, определенным п.п. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Работа оформлена, согласно приложениям № 5 и 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Климко Алёна Игоревна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. «Микробиология» и 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент: Николаев Юрий Александрович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией, ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, лаборатория выживаемости микроорганизмов.

23.05.2023

Николаев Юрий Александрович

Контактные данные:

тел.: +7(499)-135-12-29, e-mail: nikolaevya@

Специальность, по которой официальным с
03.00.07- Микробиология (биол. науки)

Адрес места работы:

117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2

Тел.: +7 (499) (499) 135-12-29