

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

В настоящее время пищевые продукты интенсивно изучаются на предмет дополнительных физиологических преимуществ, которые могут снизить риск хронических заболеваний или иным образом улучшить здоровье. Растущий интерес у населения вызывают биологически активные пищевые добавки (БАДы), функциональная роль которых направлена на компенсацию недостатка основных питательных веществ, повышение резистентности организма к воздействию вредных факторов внешней среды, оказание иммуномодулирующего эффекта, укрепление здоровья и профилактика различных заболеваний. Концепция биофункциональных пищевых добавок обычно используется, когда желаемый биологический, медицинский или физиологический эффект оказывают микроорганизмы. Такими микроорганизмами являются пробиотики - жизнеспособные микроорганизмы, благотворно влияющие на здоровье человека. Более 100 лет пристально изучается микробиом человека и его роль в начале и развитии инфекционных и неинфекционных заболеваний. Установлено, что в дистальном отделе организма их основными представителями являются лактобактерии, принимающие самое деятельное участие в формировании индигенной микробиоты и ответственные за поддержание иммунной системы человека. В ходе своего метаболизма они продуцируют целый спектр веществ, необходимых и полезных для здоровья человека.

Известно, что лактококки обладают антимикробной активностью в отношении многих родственных и неродственных микроорганизмов, включая микроорганизмы, вызывающие порчу пищевых продуктов. Их антимикробный эффект обусловлен снижением pH за счет накопления молочной кислоты как основного метаболита в процессе сбраживания углеводов, конкуренцией за питательные вещества и выработкой специфических метаболитов белковой природы - бактериоцинов (Rattanachaikunsopon, Phumkhachorn., 2010) и рекомбинантные белки (Morello et al., 2008). Физиологической особенностью природных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* является синтез бактериоцинов-лантибиотиков, среди которых наиболее известным является низин, состоящий из 34 аминокислотных остатков, включая небелковую аминокислоту лантионин, с молекулярной массой 3353 Да. Известно, что низин (БАД Е-234) обладает бактерицидным действием на грамположительные бактерии (образование пор за счет связывания с липидом 2 клеточной стенки), может адсорбироваться на поверхности спор

чувствительных к нему спорообразующих микроорганизмов, нарушает проницаемость мембран, снижает термоустойчивость спор.

Однако, низин не эффективен против грамотрицательных бактерий, к которым относятся многие энтеробактерии - возбудители инфекций ЖКТ, и микромицетов, вызывающие микозы. На кафедре микробиологии биологического факультета МГУ методом слияния протопластов родственных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*, с низкой низинсинтезирующей активностью, были получены эффективные штаммы, обладающие широким спектром бактерицидной и фунгицидной активности. Эти противомикробные молекулы входят в число полезных пептидов, которые естественным образом синтезируются некоторыми молочнокислыми бактериями во время ферментации. Антимикробные пептиды обладают бактериостатическим или бактерицидным спектром действия, который в основном направлен против бактерий, тесно связанных с штаммом-продуцентом, и в более редких случаях против широкого круга неродственных групп бактерий, таким образом, они составляют важную часть системы микробной защиты.

Помимо индигенной микробиоты, в макроорганизм с продуктами питания могут поступать молочнокислые бактерии извне. Рост и тех, и других микроорганизмов зависит от происходящих процессов в макроорганизме, в том числе свободнорадикальных. Интенсивность свободнорадикальных процессов в организме человека может быть вызвана как увеличением концентрации активных форм кислорода (АФК), свободных радикалов (OH^* , HO^* , O_2^* , NO^*), низкомолекулярных эндогенных пероксидов (H_2O_2 , ROOH , HOCl , ONOON), так и снижением эффективности действия биологических систем их утилизации и детоксикации. Свободные радикалы повреждают молекулы ДНК, белков, липидов, образуя перекисные соединения. Радикал OH^* может присоединяться, например, по двойной связи между 5- и 6-м положениями в молекуле тимидина и тем самым нарушать структуру ДНК. АФК также запускает программируемую клеточную смерть – апоптоз.

Известно, что в естественных условиях все микробы существуют не как некоторое количество самостоятельных и изолированных клеток, а находятся в составе биопленок. В организме человека микробные сообщества образуют все представители нормальной микробиоты и возбудители болезней. С их появления начинается развитие любой инфекции (O'Toole, 2000).

Накопившиеся данные о свойствах биопленок открыли новые аспекты действия антимикробных препаратов на бактерии или грибы, образующие эти биопленки (Anderl et al., 2000). Особый интерес представляет исследование возможности использования пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. для изучения способности

лактококков к синтезу нейротропных соединений, как основы для создания нового класса пробиотиков - психобиотиков (Mayer et al., 2014).

Целью работы - создание полифункциональной пищевой добавки на основе *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

В связи с целью были поставлены решены следующие **задачи**:

1. Изучить свойства штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, отобрать наиболее эффективные штаммы с пробиотическими свойствами;
2. Выявить способность к синтезу антимикробных метаболитов и нейромедиаторов в динамике роста отобранных штаммов.
3. Исследовать влияние отдельных аминокислот на рост, антимикробную активность и синтез нейромедиаторов отобранными штаммами.
4. Определить способность к образованию короткоцепочечных жирных кислот штаммами лактококков.
5. Изучить адгезионные свойства штаммов *L.lactis* subsp. *lactis*.
6. Создать лабораторный образец пищевой добавки на основе наиболее эффективного пробиотического штамма *L. lactis* subsp. *lactis*.
7. Провести апробацию лабораторного образца в модельных опытах на крысах препубертатного периода.

Диссертационная работа *расширяет имеющиеся к настоящему моменту сведения по полифункциональности свойств лактококков, синтезирующие антимикробные метаболиты, включая бактериоцины и бактериоцинподобные вещества, биологически активные метаболиты - вещества с нейротропным действием (ДОФА, дофамин, серотонин, норадреналин и др) с позиций их влияния на микробиом человека, показана их роль во взаимодействии между микробиотой кишечника и мозгом, что определяет ее*

научную новизну и практическую значимость работы.

Работа имеет **биотехнологическую** значимость в плане рекомендаций по созданию нового препарата БАД, начиная с отбора эффективного штамма, отработки условий его культивирования с целью получения желаемого метаболита.

Диссертация построена традиционно и включает 171 страницу и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, рекомендаций, списка сокращений, списка используемой литературы, приложений, включающих акт апробации лабораторного образца БАД, протокол его испытаний. Список литературы включает 203 наименования, из них 142 зарубежных источников, которые используются диссертантом при обосновании темы исследований и

обсуждения полученных экспериментальных данных. Работа содержит 7 таблиц, иллюстрирована 60 рисунками.

Во введении обосновывается актуальность изучаемой проблемы, цель и задачи исследования, представлены основные положения для защиты, научная новизна полученных результатов и их теоретическое и практическое значение.

В литературном обзоре представлен материал о свойствах лактококков *L. lactis* subsp. *lactis* и возможном применении их как биоконсерванта, характеристика биологически активных добавок, рекомендуемых для пищи и при заболеваниях ЖКТ и профилактики заболеваний, связанных с ЦНС. Большое внимание уделено короткоцепочечным жирным кислотам и аминокислотам в контексте их влияния на нервную систему.

Специальная глава посвящена бактериоцинам молочнокислых бактерий. Штаммы *Lactococcus lactis* способны к синтезу бактериоцинов, среди которых наиболее известным является низин. Диссертантом отмечено, что из молока бурятских коров выделен штамм лактококков №194, синтезирующий два бактериоцина, и этот штамм явился одним из объектов исследований автора.

В главе «**Материалы и методы**» подробно описаны методики и протоколы, использованные в работе. Эксперименты выполнены на кафедрах микробиологии и физиологии человека и животных биологического факультета, в аналитическом центре химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова», а также в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова" с использованием современных методов классической микробиологии, биохимических, и физико-химических и аналитических методов анализа.

В работе использовали природный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 и рекомбинантные штаммы *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, которые были ранее получены методом слияния протопластов родственных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* с низкой низинсинтезирующей активностью: штаммы F-119 и F-116 (GenBank: F100778.1; GenBank: EF100777.1), обладающие высокой антимикробной активностью в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов.

Результаты исследований 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.

Глава **Результаты и их обсуждение** разделена диссертантом на ряд разделов согласно поставленным ранее задачам. результаты представлены в таблицах и иллюстрированы рисунками.

Исследование антимикробной активности в динамике позволило определить период роста продуцента, когда синтез бактериоцинов достигает максимума своей активности, который 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. Синтез антимикробных соединений происходил параллельно кривой роста культур (первичные метаболиты), что отличает их от антибиотиков.

Впервые автором показано, уникальность штаммов лактококков подвида *L. lactis* subsp. *lactis* 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, которое усиливает предварительное внесение в среду культивирования ряда аминокислот, являющихся структурными компонентами бактериоцинов.

Установлена способность изучаемых штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* к синтезу биогенных аминов, их предшественников и продуктов метаболизма, что позволяет установить возможный вклад штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* по созданию БАЖ для профилактики и лечения неврозов.

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 метабиотик полифункционального назначения.

Исследования по влиянию аминокислот на синтез нейроактивных соединений штаммами лактококков показало, что исследуемые штаммы лактококков способны к синтезу экзогенных и эндогенных нейромедиаторов на разных этапах роста: так, штаммы 194, F-116 и

F,119 внутри- и внеклеточно за 9 ч культивирования повысили концентрацию 5-НТР - предшественника серотонина, а за 24 ч культивирования синтезировали катехоламины - адреналин и дофамин.

Показана способность штаммов лактококков к формированию биопленок на абиотических поверхностях, а по результатам адгезионных показателей лучшим был *L. lactis* subsp. *lactis* штамм 194.

Проведен эксперимент по сохранности БАД с использованием бетонита как криопротектора при лиофилизации штамма в сравнении с другими защитными средами. Результаты биотоксичности синтезируемых метаболитов *L. lactis* subsp. *lactis* и оценку жизнеспособности штамма на носителе продемонстрировали эффективность бентонита в модельных опытах на крысах, диссертантом показана эффективность полученного препарата БАД на основе штамма 194.

По сравнению с контрольными (кормленные обратом, водой), экспериментальные белые крысы были более жизнеспособными, активными с пониженной тревожностью, из чего следует, что выбранная пробиотическая культура способна оказывать существенное анксиолитическое воздействие. «**Заключение**», представленное в диссертационной работе, обобщает результаты диссертационной работы, что облегчает сформулировать выводы.

Выводы полностью отражают представленный экспериментальный материал по выполнению поставленных задач.

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. Не является ли низкой концентрация биогенных аминов и их предшественников в результатах по изучению нейромедиаторной активности?
2. Стоит ли все же говорить о синтезе короткоцепочечных жирных кислот в рамках изучения молочнокислых бактерий с гомоферментативным типом брожения?

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:

Ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории биологии бифидобактерий Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотрабнадзора)

Кандидат биологических наук _____ Жиленкова Ольга Геннадьевна

Контактные данные, адрес организации:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотрабнадзора) 125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова д.10; тел..+7(495)452-07-32 ; моб.тел.+7 916 220 62 87 e-mail: o.g.zhilenkova@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.02.03 – Микробиология; 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Подпись руки Жиленковой О.Г. заверяю:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотрабнадзора)

Кандидат медицинских наук _____ Сафронова Алла Васильевна

01.02.2024 г.