

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.

Диссертационная работа Климко Алёны Игоревны находится в рамках актуальной и практически значимой проблемы изучения широко распространённой в природе и практически используемой человеком группы молочно кислых микроорганизмов, для получения молочно- кислых продуктов ,продуктов для функционального питания и пробиотических препаратов. Актуальность и практическая значимость данной проблемы в настоящее время для РФ определяется необходимостью развития производств кисло-молочных заквасок для импортозамещения данной продукции (Горбатов В.А.ФНЦпищевых систем им.Горбатова В.М. РАН, 2022)

..Работа конкретно посвящена выбору пробиотического штамма МКБ, обладающего способностью роста в аэробных условиях и изучению закономерностей адаптации культуры к росту в аэробных условиях.

Научная новизна работы.

1. На основании изучения пробиотических свойств МКБ (33штамма МКБ из коллекции кафедры микробиологии МГУ) отобран наиболее активный штамм . *Lacticaseibacillus rhamnosus* МГУ 529.

2. При использовании протеомного анализа при изучения влияния аэробных условий культивирования на рост данного штамма впервые показан кислородо чувствительный синтез группы белков в клетке и повышение синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов. Впервые при измерении активности ЭТЦ показана способность экзогенного менахинона участвовать в ЭТЦ.

Теоретическая и практическая значимость работы.

1. Показаны некоторые молекулярные механизмы адаптации МКБ к условиям аэробного роста, что является основой для дальнейшего исследования аэротолерантности МКБ и клеточного ответа на окислительные стрессы..

2. Показано, что важнейшие пробиотические свойства МКБ являются штаммоспецифичными

Практическая значимость работы.

Отобран штамм, обладающий пробиотическими свойствами и способностью повышения активности роста в аэробных условиях культивирования, что повышает устойчивость препарата, его хранения и транспортировки. Установлено влияние присутствия в среде культивирования гемина и менахинона на устойчивость к окислительным стрессам, и повышение концентрации получаемой биомассы что даёт основание

для разработки режимов технологических процессов культивирования с их использованием.

Обоснованность, достоверность и новизна результатов исследований определяется использованием диссертантом современных методов ПЦР, масс-спектрометрического анализа, традиционных методов микробиологических и биохимических исследований, статистическим анализом полученных данных. .

Основные результаты работы опубликованы в 5 статьях, в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI.

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 182 стр. иллюстрирована 15 рис. и 19 таблицами. и 1 приложение .

Работа содержит: обзор литературы, главу «материалы и методы», главу 3»»Результаты и их обсуждение», Заключение и выводы.

Обзор литературы(на 69страницах). Представлен достаточно полный анализ имеющейся литературы о МКБ .как пробиотиках, об

основных требованиях, предъявляемых к ним, их биохимических свойствах, действия пробиотиков в организме человека, в кишечно-желудочном тракте

.Подробно рассмотрены имеющиеся данные об отношении МКБ к кислороду, токсическое действие аэробных условий на МКБ, биохимические основы этих процессов. ключевые ферменты антиоксидантной защиты. Представлен хорошо структурированный, иллюстрированный и обобщённый анализ литературы, касающийся свойств лактобацилл. Их классификационные признаки, биохимические, отношения к гомо- и гетероферментативному молочнокислому брожению, а также практическое использование антиоксидантных свойств МКБ.

Глава материалы и методы исследований. Основным объектом исследований являлись МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ, которые выращивали на традиционной среде MRS. в статических анаэробных условиях во флаконах, закрытых резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками или в аэробных условиях в колбах с перемешиванием. Диссертантом использован широкий набор методов определения гидрофобности поверхности клетки, образования биоплёнок МКБ, методы получения мембранных фракций клеток. Использован метод ПЦР для определения генов антиоксидантной защиты в клетках лактобацилл; методы определения активности ферментов, спектрометрические методы, масс-спектрометрический анализ, химические методы определения глюкозы. белка и др . Проведён статистический анализ полученных результатов.

В главе 3 представлены **результаты исследований.**

На основании скрининга 33 штаммов МКБ на основании определения гидрофобности клеточной поверхности, способности к образованию биоплёнок, ингибирования окисления аскорбата, антимикробной активности по отношению к условно-патогенным микроорганизмам было отобрано 15 штаммов МКБ, которые обладали лучшими пробиотическими свойствами. Из них были отобраны 5штаммов, обладающие большей гидрофобностью клеточной поверхности. Из них отобраны были два штамма, характеризующиеся наиболее интенсивным образованием биоплёнок

Lacticaseibacillus rhamnosus КМ МГУ 529 и *Levilactobacillus brevis* КМ МГУ521.Автором отмечается отсутствие корреляции между такими свойствами штаммов, как высокая гидрофобность поверхности клеток и интенсивность образования биоплёнок Эти свойства являются штаммоспецифичными. В разной степени антимикробная активность отмечена у всех исследованных культур. При использовании метода вырожденных ПЦР-праймеров было показано, что все исследованные МКБ содержали гены, кодирующие пероксидазу, и не все содержали гены, кодирующие СОД, каталазу и пероксиредоксин. При определении активности ключевых ферментов антиоксидатной активности при культивировании культур МКБ в аэробных условиях в присутствии гемина были определены активности всех ключевых ферментов антиоксидатной защиты, однако аэрация угнетала рост исследованных культур и не влияла только на рост *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529.

Данная культура была использована для **изучения механизмов адаптации к росту в аэробных условиях.** При сравнительном изучении влияния аэробных условий культивирования и так называемых дыхательных условий (в присутствии гемина и менахинона) было подтверждено, что при так называемых дыхательных условиях показатели концентрации биомассы увеличиваются (в данном опыте на 27%). Предполагается, что это связано с получением дополнительной энергии за счёт окислительного фосфорилирования в ЭТЦ. При исследовании поглощения кислорода препаратами мембран, выделенных из клеток культуры 529, выращенной аэробно показано, что препараты мембран окисляли НАДНс достаточно высокой скоростью, которая повышалась почти в 5 раз при внесении в систему менахинона, который переносит электроны от НАДНдегидрогеназы к хинолоксидазе, которая непосредственно восстанавливает кислород. При протеомном анализе лизатов клеток, выращенных статично и при интенсивной аэрации показано, что аэрация оказывает существенное влияние на протеом культуры. Из 57 белков уровень 43 белков повышался, а 14 понижался. проведена филогенетическая классификация белков на основании сходства их последовательностей с определённым кластером ортологических групп. Показано, что при интенсивной аэрации увеличивается синтез фосфокетолазы- ключевого фермента пентозофосфатного пути, т.е. происходят изменения в путях образования пирувата, который является центральным интермедиатом молочнокислого брожения. В аэрируемых клетках наблюдали повышение кислородзависимых ферментов, активность которых сопровождается образованием H_2O_2 , а также увеличивается уровень НАДН- пероксидазы, которая, очевидно, играет роль в элиминировании перекиси водорода.

В **заключении** диссертантом обобщаются полученные результаты :выбора пробиотического штамма МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ культуры *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529., при культивировании которого в аэробных условиях не снижается активность роста. Результаты изучения влияния аэробных условий

культивирования на рост штамма и изучения закономерностей адаптации штамма к росту в аэробных условиях.

Выводы достоверны и отражают результаты выполненных исследований.

В списке литературы представлены ссылки на 308 источников. Из них 95 источников за последние 10 лет и 35-за последние 5 лет.

Автореферат работы отвечает содержанию диссертации.

Принципиальных замечаний по работе нет, поскольку многие свойства штаммов являются штаммоспецифичными. целесообразно было бы представить данные об источнике выделения музейных МКБ..

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 пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Работа оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

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: Градова Нина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени М.Д.Менделеева».

24.05.2023



Градова Нина Борисовна

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.07- Микробиология (биол. науки)

Адрес места работы: 125047, Москва, Миусская пл., 9

Тел.: +7 (495) 495-23-79; e-mail: biotech@muctr.ru

