

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Урядовой Галины Тимофеевны «Биологическая активность экзополисахаридов молочнокислых бактерий и биотехнологические аспекты их использования», представленную на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы диссертации

Бактерии синтезируют огромный спектр полисахаридов, характеризующиеся структурным и функциональным многообразием. Среди этих биополимеров следует отметить гликаны мембран, капсульные полисахариды, связанные с поверхностью клетки, экскретируемые в окружающую среду экзополисахариды (ЭПС), а также полисахаридные компоненты матрикса биопленок. Многообразие структур, обусловленное множеством моносахаридов, различием их комбинаций и типов связей в полимере, а также наличием неуглеводных заместителей, составляет основу биологических функций бактериальных полисахаридов, среди которых антигенность, токсичность, связывание двухвалентных катионов металлов, специфичность взаимодействия с микро- и макроорганизмами, устойчивость к высыханию, защита от неспецифического и специфического иммунитета макроорганизма и т.д.

Молочнокислые бактерии, продуцирующие ЭПС, принадлежат к разным родам, распространенным в различных местообитаниях, и делятся на две большие группы – продуцирующие гомополисахариды, состоящие из одного типа моносахаридных звеньев, и – гетерополисахариды, состоящие из различных моносахаридных остатков. Основными продуцентами гетерополисахаридных ЭПС являются штаммы *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*, часто выделяемые из ферментированных молочных продуктов и желудочно-кишечного тракта человека, а среди продуцентов гомополисахаридных ЭПС отмечены штаммы *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* и *Weissella*, выделенные из овощей, ферментированных напитков и желудочно-кишечного тракта животных.

Биологическая активность ЭПС молочнокислых бактерий позволяет их довольно широко использовать в пищевой, фармацевтической промышленности, медицине, животноводстве, а также в различных биотехнологических производствах. Использование ЭПС молочнокислых бактерий в пищевой промышленности способствует улучшению органолептических и реологических свойств, а также увеличению сроков хранения продуктов. Очень часто данные ЭПС являются функциональными пробиотиками, характеризующимися иммуномодулирующими, антиоксидантными, противовоспалительными, противомикробными, противоопухолевыми и др. свойствами. Пробиотические свойства ЭПС молочнокислых бактерий и связанное с ними как местное, так и системное

воздействие на организм-хозяина, могут иметь большой потенциал при включении в рацион сельскохозяйственных животных для улучшения их продуктивности, санитарии и здравоохранения.

В этой связи работа Г.Т. Урядовой, посвященная анализу биологической активности ЭПС молочнокислых бактерий и возможного биотехнологического их использования, является актуальной.

Достоверность и новизна результатов и выводов

Достоверность научных результатов и сформулированных на основании их анализа выводов не вызывает сомнения и определяется значительным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием стандартных микробиологических, биохимических, микроскопических и физиологических методов исследования. План экспериментальной части работы составлен логично и последовательно, каждый этап является продолжением предыдущего. Для решения каждой задачи были подобраны адекватные методы, а полученные результаты были корректно статистически проанализированы.

При оценке новизны полученных результатов следует особо выделить следующие ключевые моменты:

1. Для исследуемых ЭПС бактерий *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus* показано отсутствие токсичности в отношении тест-объектов *Colpoda steinii* и новозеландских кроликов. Установлено, что ЭПС исследуемых штаммов активирует продукцию провоспалительного интерлейкина 1 α альвеолярными и перитонеальными макрофагами белых мышей, а также стимулирует их фагоцитарную активность, при этом активность ЭПС *S. thermophilus* была достоверно выше таковой *L. lactis* В-1662.
2. Показано, что пленочные покрытия из карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) с добавлением ЭПС молочнокислых бактерий, обладающие высокой прочностью и растяжимостью, и растворы данных ЭПС способствуют заживлению ожоговых ран на коже крыс с последующим восстановлением шерстяного покрова, сопровождающиеся уменьшением числа бактерий группы кишечной палочки и стафилококков на раневой поверхности. Для ЭПС исследуемых кисломолочных бактерий охарактеризован спектр антимикробной активности.
3. Установлено, что введение в корм ленского осетра (*Acipenser baerii*) в качестве пищевой добавки ЭПС *S. thermophilus* приводит к снижению затрат на кормление, увеличению живой массы рыбы, улучшению органолептических показателей рыбы.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Диссертационная работа Г.Т. Урядовой представляет исследование биологической активности экстраклеточных гликополимеров молочнокислых бактерий *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662. В ходе выполнения экспериментальной части исследования впервые была выявлена

антимикробная активность исследуемых ЭПС в отношении условно-патогенных бактерий. Выявлено стимулирующее влияние ЭПС *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 на фагоцитарную активность и продукцию провоспалительного интерлейкина 1α альвеолярными и перитонеальными макрофагами белых мышей. Получены и охарактеризованы комбинированные пленки на основе КМЦ и ЭПС. Для пленочных материалов или растворов ЭПС *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 установлено ранозаживляющее действие при лечении ожогов кожи крыс, сопровождающееся снижением бактерий группы кишечной палочки и стафилококков на раневых поверхностях. Продемонстрировано положительное влияние ЭПС *S. thermophilus* при использовании в качестве кормовой добавки на выход живой массы и органолептические показатели рыбы. Проведенные эксперименты расширяют представление о физиологической активности ЭПС молочнокислых бактерий. Результаты диссертационной работы подкреплены актами внедрения, и, следовательно, являются перспективными для практического использования. Следует отметить, что материал диссертационной работы и собранные в ней методические приемы используются в учебном процессе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» (ныне «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова») при чтении курсов лекций по микробиологии, биотехнологии, проведении лабораторно-практических занятий и написания квалификационных работ.

Содержание диссертации, ее завершенность, публикации автора в научной печати

Диссертация состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части, описывающей материалы и методы исследования, а также результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов, списка используемой литературы, включающего 223 литературных источника, в том числе 105 зарубежных. Материалы диссертации изложены на 117 страницах и иллюстрированы 5 рисунками и 24 таблицами. Приложения содержат два акта о внедрении результатов диссертационной работы.

В обзоре литературы очень лаконично обобщены сведения о молочнокислых бактериях и продуцируемых ими ЭПС, а также сферах их использования. Сведения, представленные в обзоре, грамотно изложены, систематизированы и критически осмыслены автором. Обзор литературы позволяет сделать заключение, что диссертант осведомлен о современном состоянии исследований в данной области науки. Не остается сомнений в обоснованности и актуальности темы исследования.

Изложенный в главе 2 диссертации материал позволяет получить исчерпывающее представление о спектре методических подходов, используемых в экспериментальной части работы, среди которых методы работы с микробиологическими культурами, биотехнологические методы,

физико-химические методы анализа полимеров и материалов на их основе, биохимические методы анализа, а также иммунологические методы и др.

Результаты исследований изложены в десяти разделах и последовательно описывают оценку токсичности ЭПС двух исследуемых штаммов молочнокислых бактерий, их бактерицидное и фунгицидное действие в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов р. *Candida*, изменение цитокинового статуса мышей и процесс фагоцитоза под влиянием исследуемых ЭПС при моделировании стафилококковой инфекции, анализ физиологических и органолептических показателей ленского осетра при введении в корм ЭПС молочнокислых бактерий, характеристику пленочных материалов на основе КМЦ и ЭПС *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662, а также влияния ЭПС на заживление ожогов у крыс. Все экспериментальные работы были осуществлены при непосредственном участии диссертанта.

Работу завершает заключение, в краткой форме обобщающее результаты проведенных исследований и резюмирующее их. Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованы и достоверны. Говоря о работе в целом, необходимо заключить, что она написана научным языком и хорошо оформлена. Рисунки и таблицы в достаточной мере иллюстрируют полученные автором результаты.

Замечания и вопросы

Существенных недостатков у оппонируемой работы не выявлено, а указанные ниже недочеты и замечания никоим образом не умаляют значимость предпринятых диссертантом усилий в получении достоверных научных результатов.

Следует отметить, что приведенный на стр. 90 список не содержит несколько сокращений и условных обозначений, приведенных в тексте, например GRAS, НК, ИЗФ, ЖСА, ФИ, РТПХ, ЗГЗГ и др. а в некоторых случаях после введения аббревиатуры в тексте термин многократно используется в несокращенном варианте. В тексте присутствуют некоторые погрешности оформления, выражающиеся в наличии опечаток.

В оформлении рисунков и таблиц допущены некоторые отступления от требований ГОСТ. Таблицы 5 и 6 было бы целесообразно объединить для облегчения восприятия результатов об антибактериальной активности исследуемых ЭПС. Кроме того, с учетом различий в молекулярных массах исследуемых ЭПС, а также их моносахаридном составе, следует предполагать, что они с разной скоростью могут диффундировать в агаризованной культуральной среде. Было бы корректно использовать дополнительный тест для оценки антимикробной активности ЭПС в жидкой питательной среде, а также определить минимальную ингибирующую концентрацию ЭПС.

Результаты, представленные в таблицах 7 и 8, было бы логичнее привести в виде диаграмм в объединенном рисунке. Это позволило бы наглядно оценить наличие различий в синтезе интерлейкина 1 α и фактора некроза опухоли α различными макрофагами мышей в динамике процесса

фагоцитоза. К сожалению, в работе не указаны условия культивирования макрофагов.

Описание определения показателей и растяжимости пленочных покрытий (стр. 60) логичнее было бы перенести в методический раздел.

На страницах 77 и 80 использованы тождесловные абзацы.

В ходе ознакомления с материалами диссертационной работы возник ряд **вопросов**:

В работе показана более высокая фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов по сравнению с перитонеальными, но в то же время они синтезировали значительно меньшее количество цитокинов. Чем обусловлен данный эффект?

Одним из физиологических параметров, наблюдаемых при введении ЭПС в рацион ленского осетра, было увеличение кисломолочных бактерий в микрофлоре кишечника рыб. Относится ли эта численность к физиологической норме, а если нет, чем вызвано подобное увеличение?

Полученные в работе пленочные покрытия на основе КМЦ и ЭПС характеризовались значительно большей толщиной, чем используемые пленочные материалы сравнения. В чем была технологическая трудность получения опытных пленочных покрытий меньшей толщины?

Опубликованные результаты диссертации в научной печати

По материалам диссертационной работы в научной печати опубликовано 24 работы, в том числе пять статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Содержание автореферата

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Урядовой Галины Тимофеевны, представленная на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук, по объему и научно-методическому уровню выполненных исследований является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся приоритетные данные о биологической активности экзополисахаридов молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus*. По актуальности тематики, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и полноте их изложения, обоснованности выводов диссертационная работа соответствует специальности 1.5.6 – Биотехнология и в полной мере удовлетворяет требованиям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней» (в редакции Постановления

Правительства РФ от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Урядова Галина Тимофеевна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук.

Официальный оппонент
кандидат биологических наук, доцент (03.00.07 – микробиология)
заведующий лабораторией биохимии
Института биохимии и физиологии
растений и микроорганизмов –
обособленного структурного подразделения
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр Российской академии наук»
410049 г. Саратов, пр-т Энтузиастов, д. 13
+7(8452)970444;
fedonenko_yu@ibppm.ru



Федоненко Юлия Петровна

05.09.2022.

Личную подпись Юлии Петровны Федоненко заверяю
ученый секретарь Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр Российской академии наук»
кандидат биологических наук



О.Г. Селиванова