

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук, профессора, заведующего кафедрой биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского» **Конновой Светланы Анатольевны**

на диссертационную работу **Фокиной Надежды Александровны** "Выделение, характеристика экзополисахаридов молочнокислых бактерий и перспективы их применения", представленную на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы выполненной работы

Экзо- и капсульные полисахариды - высокомолекулярные природные гликополимеры, локализованные на поверхности бактерий и секретирующиеся в окружающую среду, защищают их от негативного действия различных факторов: токсинов, антибиотиков, кислых и щелочных сред, высоких и низких температур, высыхания и прочих. В силу поверхностной локализации внеклеточные гликополимеры играют важную роль в процессах коммуникации организмов, иммобилизации их на поверхностях, в формировании матрикса биоплёнок, служат источником углерода в условиях голодания, индуцируют иммунный ответ при проникновении в организм теплокровных животных и человека. Такое многообразие функций связано с высоким структурным разнообразием, которое ответственно и за их физико-химические свойства, и за физиологическую активность. Экзополисахариды (ЭПС), в особенности молочнокислых бактерий, в последние годы находят широкое применение в различных отраслях промышленности, в медицине, ветеринарии, в пищевых производствах, в технологиях получения кисломолочных продуктов. При высокой востребованности ЭПС в Российской Федерации производство биотехнологически значимых препаратов полисахаридов развито слабо. Поиск бактериальных ЭПС и выявление их активности, перспектив их использования является важной и актуальной задачей, которой и посвящена представленная к защите диссертационная работа Фокиной Надежды Александровны.

Обоснованность научных положений, рекомендаций и достоверность результатов исследований, представленных в диссертации Фокиной Н.А., подтверждается корректностью применения статистических методов с использованием для анализа результатов программного обеспечения StatPlus 2007

Professional 4.9.4.1. Исследования выполнены с использованием современных высокоточных методов анализа, стандартных методик и приемов биотехнологии, микробиологии, биохимии, адекватных поставленным задачам исследования.

Результаты работы по теме прошли убедительную апробацию и представлялись, начиная с 2011 года, на многочисленных международных, всероссийских и региональных научных конференциях.

Полученные в ходе диссертационных исследований данные достаточно полно представлены в 22 опубликованных работах, из них 3 статьи в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ, 1 статье в журнале, индексируемом в международной информационно-аналитической системе научного цитирования Scopus. Приоритетность полученных данных подтверждена патентом.

Научная новизна исследований, результатов и выводов

Представлены результаты исследований ЭПС двух ранее неизученных культур молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* B1662 и *Streptococcus thermophilus*, для которых оптимизированы условия выращивания по продукции полисахаридов. Выявлены оптимальные для этой цели источники углерода, продолжительность выращивания бактерий, температурный режим и значения водородного показателя, что важно при стандартизации технологического процесса получения гликополимеров для их практического использования.

Полученные из культуральной жидкости бактерий *L. lactis* B1662 и *S. thermophilus*, выращенных в оптимизированных условиях, ЭПС впервые охарактеризованы по физико-химическим свойствам и моносахаридному составу.

Выявлено положительное влияние полученных ЭПС, в особенности стрептококковых, на динамику заживления ожоговых ран у лабораторных животных. Достоверно показано положительное влияние на рост массы тела и структуру микробиома кишечника сельскохозяйственной птицы введение ЭПС перорально.

Значимость для науки и производства, полученных автором диссертации результатов

Выполненные автором исследования ЭПС молочнокислых бактерий *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* и выявление положительных эффектов воздействия на животных открывает в дальнейшем перспективы их практического использования

в сельском хозяйстве. Технология выращивания цыплят – бройлеров с использованием ЭПС лактобактерий защищена патентом №273967 от 23.11.2020 г. Полученные автором результаты исследования активно используются в учебном процессе для студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», изданы в 2019 и 2020 годах методические рекомендации по изучению физиологической активности экзополисахаридов в отношении млекопитающих и птиц.

Диссертационная работа Фокиной Н.А построена по традиционной схеме, изложена на 112 страницах текста, включает 7 таблиц и 15 рисунков, состоит из введения, аналитического обзора литературы, экспериментальной части, выводов, библиографического списка, включающего 230 источников, в том числе 131 - зарубежных авторов.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности, сформулирована цель и 5 задач, направленных на ее реализацию, приведены аргументы, демонстрирующие научную новизну и практическую значимость результатов, представленных в диссертационной работе. Четыре положения, выносимые на защиту, отражают основные достижения автора, полученные в ходе исследований.

Обзор литературы занимает 24 страницы диссертационной работы, включает раздел с общей характеристикой ЭПС микроорганизмов (почвенных и ризосферных, морских, фитопатогенных, а также молочнокислых микроорганизмов): их локализацию, классификацию, структурное разнообразие.

Второй раздел - с функциональной характеристикой экзополисахаридов, и третий - с описанием их практического использования в различных отраслях деятельности.

В разделе 2.1 «Объекты и методы исследования», изложенном на 8 страницах текста, представлены микробиологические характеристики объектов исследований, состав сред для выращивания бактерий, методы выделения и фракционирования их ЭПС, методология изучения физико-химических свойств и моносахаридного состава гликополимеров. Представлены методы работы с животными.

Раздел 2.2 второй главы – «Результаты исследования и их обсуждение» изложен на 39 страницах текста. Каждый подраздел снабжен небольшим

литературным вступлением и обоснованием выбора варьируемых параметров при оптимизации условий выращивания бактерий. Проведенные исследования позволили оптимизировать условия выращивания продуцентов, для получения экзополисахаридов. Гликополимеры каждого штамма охарактеризованы данными о моносахаридном составе, молекулярных массах, физико-химических свойствах, которые согласуются с литературными данными других авторов.

Исследования активности ЭПС молочнокислых бактерий в отношении скорости заживления ожоговых ран у крыс и физиологической активности при пероральном введении в течение нескольких месяцев цыплятам – бройлерам показали достоверные положительные эффекты на исследуемые процессы и перспективность применения данных гликополимеров в медицине и сельском хозяйстве.

Результаты исследований изложены логично, подтверждены достоверностью различий показателей между контрольными и опытными группами животных, сделанные выводы убедительны. Заключение и выводы диссертации полно и точно резюмируют основные положения работы. Автореферат и публикации автора отражают основное содержание и положения диссертационной работы.

В ходе рецензирования работы возникли некоторые замечания по подготовке текста диссертации:

Считаю, что в обзоре было бы не лишним выделить в отдельный раздел описание ЭПС представителей исследуемых видов и родов бактерий, характеристику их выходов, вязкости, молекулярных масс и прочих параметров, исследуемых автором, что важно для сравнительного анализа полученных диссертантом данных.

К сожалению, обзор недостаточно хорошо выверен: содержит неудачные выражения, стилистические ошибки, например стр. 13 абзац 4: «Третью группу ЭПС формируют гомополисахариды, состоящие, как правило, из углеводов...», стр. 14 абзац 2: «...полные альгинаты... формируют хорошо вязкие и клейкие растворы»; стр. 16 абзац 2: «...внеклеточные гетерополисахариды - это в основном линейные молекулы, к которым через равные промежутки времени присоединяются боковые цепи различной длины...»; и др.

Не все использованные литературные источники приведены в списке цитированной литературы: например отсутствуют ссылки Лендсфилд, 1933 г. (цит. на стр.37); Воробьев, Елеуков, 1989 (цит. на стр.43) и др.

Имеются замечания к оформлению рисунков в разделе 2.2. На рисунках 1 и 2 представлено по одной оси ординат, хотя измерялись по два параметра: оптическая плотность клеточной суспензии и выход ЭПС в мг или г на литр среды выращивания.

Из таблицы 3 не совсем понятно, каким образом молекулярная масса глюкозы оценена в 6 кДа.

Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии – на рисунках 8 и 11 хорошо было бы прокомментировать в плане идентификации пиков и интерпретации полученных результатов, а также пояснить в подписи присутствие 2-х хроматограмм на рисунке.

При этом рисунок 9 не является хроматограммой, как указано в подписи, а по описанию автора является калибровочным графиком соответствия молекулярных масс стандартных декстранов и объема элюирующего раствора, вымывающего их с колонки.

При прочтении диссертации также возникли следующие вопросы к автору: хотелось бы услышать мнение автора относительно механизма положительного воздействия экзополисахаридов на исследуемые процессы и животных, учитывая, что сами полисахариды не несут заряда, включают в свой состав нейтральные моносахариды.

И, кроме того, как оценивает автор конкурентоспособность полученных ЭПС по сравнению с уже известными гликополимерами, учитывая относительно невысокий выход этих гликанов и необходимость использования для их получения богатой углеводами среды выращивания бактерий-продуцентов.

Сделанные замечания и выявленные недочеты не носят принципиального характера и не снижают общей положительной оценки работы, ее значимости для науки и производства.

Заключение

По результатам анализа диссертационной работы считаю, что по актуальности темы, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне диссертационное исследование Фокиной Надежды Александровны на тему "Выделение,

характеристика экзополисахаридов молочнокислых бактерий и перспективы их применения", соответствует специальности 1.5.6 – Биотехнология и требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. в ред. от 01.10.2018 г. с изм. от 26.05.2020), а ее автор, Фокина Надежда Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Официальный оппонент
Коннова Светлана Анатольевна
доктор биологических наук
03.00.04 – биохимия (биологические науки) (2003 г.)
Профессор
Заведующий кафедрой биохимии и биофизики
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «СГУ имени Н.Г. Чернышевского»

 С.А. Коннова



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»
Биологический факультет
410012, ул. Астраханская д. 83, г. Саратов
Контактный телефон +79172183221
e-mail: Konnovasa@yandex.ru