

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 99.0.027.03,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ РОССИЙСКОГО ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ТВЕРСКОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА МИНИСТЕРСТВА
НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ,
ИНСТИТУТА БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМЕНИ
Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело
№

решение диссертационного
совета
от «27» февраля 2024 года № 3

О присуждении Евдокимовой Светлане Александровне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Метод конструирования синбиотических композиций направленного действия для подавления роста патогенов» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите «19» декабря 2023 года (протокол № 14) диссертационным советом 99.0.027.03, созданным на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук (125047, Москва, Миусская площадь, 9, приказ о создании диссертационного совета от «28» сентября 2016 года №1172/нк).

Соискатель Евдокимова Светлана Александровна, «28» марта 1994 года рождения, в 2018 году окончила Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева. В 2022 году освоила программу подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева. В настоящее время работает в должности ассистента кафедры биотехнологии Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация выполнена на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат технических наук Кареткин Борис Алексеевич, доцент кафедры биотехнологии Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева.

Официальные оппоненты:

Корнеева Ольга Сергеевна, гражданка Российской Федерации, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий»;

Сорокина Елена Владимировна, гражданка Российской Федерации, кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет» (Ставрополь) в своем **положительном** отзыве, подписанном доктором технических наук, доцентом, заведующим кафедрой прикладной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий Лодыгиным Алексеем Дмитриевичем, указала, что диссертационная работа «Метод конструирования синбиотических композиций направленного действия для подавления роста патогенов», представленная на официальное оппонирование, является законченной научно-квалификационной работой, в которой изложены новые научно-обоснованные принципы конструирования синбиотиков для борьбы с микробными контаминантами пищи и кишечными патогенами, что вносит значительный вклад в исследование, разработку и оценку эффективности функциональных продуктов питания. Диссертация соответствует требованиям пп 9-11, 13 и 14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в текущей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор, Евдокимова Светлана Александровна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (отзыв обсужден и утвержден на расширенном заседании кафедры прикладной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий «05» февраля 2024 года, протокол № 8).

Соискатель имеет 27 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 22 работы, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 11 работ. Общий объем публикаций составляет 175 страниц. **В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах.** Все работы по теме диссертации опубликованы с соавторами, личный вклад автора составляет не менее 50 % и состоит в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, систематизации и интерпретации результатов, формулировке выводов, подготовке и оформлении материалов исследований для публикаций, а также их представлении на международных и российских конференциях. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на 9 международных и всероссийских научных конференциях и форумах; монографий и депонированных рукописей соискатель не имеет.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. A Study and Modeling of Bifidobacterium and Bacillus Coculture Continuous Fermentation under Distal Intestine Simulated Conditions / **Evdokimova S.A.**, Karetkin B.A. et al. // *Microorganisms*. - 2022. - Т. 10. - №5. – С. 929. (**Scopus, Web of Science**)
2. An assessment of the influence of various factors to antagonistic activity of the synbiotics using the response surface methodology / **Evdokimova S.A.**, Karetkin B.A. et al. // *Foods and Raw Materials*. – 2022.-Т.10. - №2. – P. 365-376. (**Scopus, Web of Science**)
3. A Study on the Synbiotic Composition of *Bifidobacterium bifidum* and Fructans from *Arctium lappa* Roots and *Helianthus tuberosus* Tubers against *Staphylococcus aureus* / **Evdokimova S.A.**, Karetkin B.A. et al. // *Microorganisms*. – 2021. – Т. 9. – №. 5. – С. 930. (**Scopus, Web of Science**)

На диссертацию и автореферат поступило 6 отзывов, **все положительные**. В отзывах указывается, что представленная к защите диссертационная работа характеризуется высокой актуальностью, научной ценностью и имеет большое значение для развития биотехнологической отрасли промышленности Российской Федерации. Отзывы направили:

1. Хабибуллин Рустем Эдуардович, доктор технических наук, доцент, профессор кафедры технологии мясных и молочных продуктов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», и Ежкова Галина Олеговна, доктор биологических наук, профессор, заведующий той же кафедрой. В отзыве указаны следующие замечания: (1) в работе не приведены данные о характеристиках разработанных биопрепаратов, какова их товарная форма, физико-химические, потребительские и технологические свойства; (2) правомерным представляется вопрос об изменении этих свойств, включая антагонистическую активность, при хранении этих препаратов.

2. Селицкая Ольга Валентиновна, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева». В отзыве приведены следующие замечания и вопросы: (1) в автореферате не приведена характеристика объектов исследования, использованных в работе; (2) почему в качестве тест-объектов были выбраны именно эти три вида бактерий (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella enterica*?); (3) рисунок 2 автореферата очень мелкий и в черно-белом варианте плохо читается.

3. Машенцева Наталья Геннадьевна, доктор технических наук, профессор, профессор кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет», и Фоменко Иван Андреевич, кандидат технических наук, доцент той же кафедры. В отзыве приведены следующие замечания и вопросы: (1) В автореферате не указаны подробно объекты исследования, в частности пробиотические культуры. Какие штаммы пробиотических культур использовались в работе? На чем основывался выбор эти культур? (2) Какие методы ингибирования пробиотиками тест-культур

были использованы в работе? Были ли исследованы другие метаболиты пробиотических микроорганизмов с антимикробным действием, помимо органических кислот?

4. Колпакова Валентина Васильевна, кандидат биологических наук, доктор технических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделом биотехнологии комплексной переработки крахмалсодержащего сырья Всероссийского научно-исследовательского института крахмала и переработки крахмалсодержащего сырья – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха». В отзыве замечания отсутствуют.

5. Николаев Юрий Александрович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией выживаемости микроорганизмов Института микробиологии имени С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», и Литти Юрий Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии антропогенных мест обитания того же института. В отзыве имеются следующие замечания: (1) требуется придерживаться единообразия в родовых названиях бактерий, напр. либо *Bac. cereus* либо *B. cereus*, и так далее; (2) есть грамматические ошибки, например, в формулировке задачи 7 вместо «в указанный условиях» нужно было написать «в указанных условиях»; (3) на рисунке 2 не представлены отклонения, что не позволяет увидеть статистически значимые различия между исследованными группами; (4) требуется единообразие в рисунках, например, на рис. 5 названия оси X и легенда полностью на английском, хотя на остальных рисунках обозначения в основном на русском.

6. Самойленко Владимир Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий центром экспериментальной биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» Российской академии наук. По автореферату указаны следующие замечания: (1) в работе не приведено обоснование выбора пробиотиков на основе бифидумбактерий из широкого спектра других продуцентов; (2) автором в качестве активных экзометаболитов рассматриваются только органические кислоты – в литературе описано ряд других веществ: бактериоцины, пептиды.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что они являются признанными специалистами в данной области биотехнологии, что подтверждается наличием соответствующих публикаций в ведущих научных рецензируемых изданиях, а также спецификой и профилем диссертационной работы, и выполнен в соответствии с подпунктами 22 и 24 «Положения о присуждении научных степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 в действующей редакции).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: *разработан* новый подход для оценки эффективности синбиотиков с применением математической модели и количественного критерия ингибирования роста тест-штамма метаболитами пробиотика при их совместном культивировании. *Установлены* количественные взаимосвязи между начальной численностью тест-штамма и пробиотика, структурой пребиотика и антагонизмом

синбиотической композиции с применением методологии активного эксперимента. *Изучены* закономерности роста пробиотика и тест-штамма в моно- и со-культуре в одностадийной непрерывной модели кишечника. *Разработана* математическая модель, позволяющая установить количественные параметры их взаимодействия. *Исследовано* влияние микробного контаминанта на биоценоз кишечника на фоне предварительного введения пробиотика с применением трехстадийной непрерывной *in vitro* модели.

Теоретическая значимость исследований обоснована тем, что: предложен подход и создана математическая модель, описывающая ингибирование роста тест-штамма метаболитами пробиотика, из которой был выведен количественный критерий эффективности синбиотиков. Установленные закономерности являются теоретической основой для конструирования синбиотических композиций. Впервые проведено сравнение влияния микробного контаминанта на биоценоз кишечника на фоне предварительного введения пробиотика с применением трехстадийной непрерывной *in vitro* модели толстого кишечника. Установлено, что математическая модель, основанная на константах ингибирования органическими кислотами, описывает подавление роста тест-штамма с приемлемой точностью.

Значение полученных соискателем результатов исследований для практики подтверждается тем, что: разработан метод оценки эффективности синбиотических композиций, основанный на периодическом совместном культивировании пробиотика и тест-штамма в среде с пребиотиком, и предложен количественный критерий, основанный на ингибировании роста тест-штамма. Метод позволяет выявить комбинацию пробиотика и пребиотика с максимальным воздействием на рост тест-штамма и может использоваться для сравнения большого количества комбинаций. Указанные метод и критерий применены для обоснования оптимального состава и конструирования синбиотической композиции на основе бифидобактерий и фруктанов, выделенных из растительного сырья. Данные, полученные при одностадийном непрерывном культивировании, позволили расширить разработанную математическую модель и приблизить её к условиям кишечника, что является необходимым для детального изучения выбранных ранее синбиотических композиций. Полученные в одностадийной и трёхстадийной функциональных моделях результаты и выявленные закономерности роста представляют ценность для понимания экологических взаимодействий в кишечном биоценозе. Экспериментальные данные были использованы для создания специализированного программно-алгоритмического обеспечения для нейросетевого моделирования микробиологических процессов. Данные модели могут быть применены для исследования процессов колонизации микробного сообщества микроорганизмами-симбионтами, а также его контаминации патогенами.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- выводы диссертации обоснованы, не вызывают сомнения и согласуются с современными подходами к выбору объектов и методов исследования;
- достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов эксперимента, соответствующих современному научному уровню;
- результаты получены с использованием сертифицированного оборудования, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях;

- теория построена на фундаментальных законах, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в том, что автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, систематизации и интерпретации результатов, формулировке выводов, подготовке и оформлении материалов исследований для публикаций, а также их представлении на международных и российских конференциях.

В ходе защиты диссертации были заданы **следующие вопросы:**

1. Как Вы докажете, что процессы, протекающие в этой установке, эквивалентны процессам, протекающим в кишечнике?
2. Вы моделируете не весь кишечник, а какой-то отдельный процесс?
3. Насколько Вы можете гарантировать, что Вы правильно определили коэффициенты уравнения регрессии для расчета симбиотического фактора?
4. Какие параметры использовали для метода наименьших квадратов? S_K откуда берется?
5. Скажите, пожалуйста, вот у Вас была единственная модель, или Вы эту модель выбрали на основании сравнения с какими-то другими?
6. Поясните вид верхней кривой на рисунке 13. Почему кривые не сглажены?
7. Почему именно такие пробиотики? Почему именно такие пребиотики? И, наконец, почему именно такие патогенные тест-системы?
8. Почему степень полимеризации олигофруктанов влияет на ингибирование?
9. У Вас в толстом кишечнике pH 5,5, а вообще в кишечнике у нас pH до 6, а в тонком вообще 7-8, почему так? За счет метаболитов бифидобактерий?
10. На слайде 18 двухфакторный отклик и уравнение второй степени, параболоид, но Вы берете по первому фактору первую степень, а по второму фактору вторую. Вы от нее отказались после определения коэффициента или заранее?

Соискатель Евдокимова С.А. ответила на заданные ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

1. **На первый вопрос автор пояснила**, что трёхстадийная непрерывная функциональная модель достаточно широко распространена в литературе. Она часто применяется для моделирования именно микробиоты кишечника. Разумеется, в ней не учитываются такие параметры, как пленкообразование, воздействие иммунитета организма-хозяина, но в целом общепризнанно, что она может использоваться как функциональная модель кишечника. По крайней мере, взаимодействие между различными членами микробиоты, в ней представлены в соответствии с реальной системой.
2. **На второй вопрос автор ответила**, что моделировали толстый кишечник человека. Восходящий, поперечный, нисходящий отделы его, и в первую очередь все модели были сфокусированы именно на антагонизме бифидобактерий в отношении тест-штамма, но в данном случае еще и полезных членов микробиоты.
3. **На третий вопрос автор отметила**, что сами значения симбиотического фактора примерно такие значения и принимают. Полученное уравнение

было адекватным. Критерий Фишера расчетный был меньше табличного, поэтому говорили об адекватности уравнения.

4. **На четвертый вопрос автор пояснила**, что C_K – это коэффициенты уравнения регрессии. t_d учитывает длительность лаг-фазы. Для расчета коэффициентов уравнения регрессии использовали метод наименьших квадратов. Из экспериментальных данных были взяты концентрации кислот – молочной и уксусной, и продолжительность лаг-фазы. На основании экспериментальных данных были рассчитаны коэффициенты уравнения регрессии.
5. **На пятый вопрос автор отметила**, что первоначально были использованы модели, представленные для периодического культивирования. Это классические модели, представленные в литературе, с некоторыми модификациями. В работе учитывали значение кислот не как эффект от суммы концентраций кислот, а действие каждой кислоты по отдельности. Данные модели в дальнейшем были расширены с учетом параметров непрерывного культивирования. Модель для непрерывного культивирования была дополнена коэффициентом, учитывающим лаг-фазу, и константой Моно для лимитирующего рост бактерий аминокислот.
6. **На шестой вопрос автор пояснила**, что верхняя кривая – это кривая роста моно-культуры бактерий. Экспериментально полученные кривые не сглаживали.
7. **На седьмой вопрос автор ответила**, что *Bifidobacterium adolescentis* был выбран, потому что вид *adolescentis* входит в число общепризнанных пробиотических видов или видов, рассматриваемых как потенциальные пробиотики. Поскольку основная масса экспериментов была проведена с олигофруктозой в качестве контрольного пребиотика, данный штамм был выбран, поскольку у него была максимальная среди представленных бета-фруктофуранозидазная активность. *Bifidobacterium bifidum* ВКПМ 1666 – это типовой штамм, который, в соответствии с паспортом, соответствует штамму, первоначально выделенному еще Тизье. *Bifidobacterium bifidum* 8, это штамм, который получен от непосредственного производителя пробиотиков, имеет доказанную пробиотическую активность и коммерчески доступен. Что касается тест-штаммов, данные штаммы чаще всего используются как тест-штаммы на антибиотики, на чувствительность к антибиотикам и на антагонизм. *Bacillus cereus* – это распространенный контаминант пищи, он способен к спорообразованию, поэтому с ним достаточно тяжело бороться. Сальмонеллы и стафилококк также обнаруживают при пищевых отравлениях. Они часто проявляют себя как возбудители вторичных госпитальных инфекций, поскольку проявляют антибиотикорезистентность. Поэтому данные объекты были выбраны как наиболее значимые мишени для ингибирования с помощью симбиотических композиций с направленным действием.
8. **На восьмой вопрос автор пояснила**, что бифидобактерии благодаря бета-фруктофуранозидазной активности способны разлагать биополимеры, но к этому не способны тест-штаммы. Эффективность повышается за счет того,


что субстрат становится наименее доступным для негативных членов сообщества.


9. На девятый вопрос автор уточнила, что трехстадийная функциональная модель имитировала три отдела толстого кишечника, соответственно восходящий, поперечный и нисходящий. Значения pH в них были 5.5, 6.2 и 6.8, в соответствии с литературой. Сообщества восходящих и поперечных отделов более кислые, в них больше представлено лактобактерий. В дистальном отделе толстого кишечника сосредоточена основная часть микробиоты за счет нейтрального pH. Там наиболее разнообразное микробное сообщество и наиболее интересные связи между ними.
10. На десятый вопрос автор ответила, что определяли все коэффициенты и откидывали незначимые.

На заседании «27» февраля 2024 года диссертационный совет за решение научной задачи по разработке метода конструирования синбиотических композиций направленного действия для подавления роста патогенов, имеющей существенное значение для развития биотехнологии, принял решение присудить Евдокимовой Светлане Александровне ученую степень кандидата биологических наук.

Диссертация соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в действующей редакции). По своему содержанию диссертация отвечает паспорту научной специальности 1.5.6. Биотехнология по направлениям исследования 12. «Биотехнология растительных и животных клеток. Контроль качества и оценка безопасности пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических препаратов»; 16. «Пищевая биотехнология, получение пищевых добавок и функциональных ингредиентов»; 21. «Инженерия биопроцессов, включая кинетику и моделирование биологических систем, создание биореакторов и систем мониторинга и контроля»; 25. «Технологии биологически-активных соединений и биопрепаратов». Результаты работы могут быть рекомендованы для изучения и внедрения в научных и образовательных организациях, а также на предприятиях пищевой и химической промышленности.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 18 докторов наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18 (восемнадцать), против – нет, недействительных бюллетеней – 1 (один).

Председатель диссертационного совета  Виктор Иванович Панфилов

Ученый секретарь диссертационного совета  Ирина Васильевна Шакир



27.02.2024