

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 ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,  
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело

№ \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета  
от «11» июня 2024 года № 11

О присуждении Лушникову Алексею Валерьевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата технических наук.

Диссертация «Бактериостатическая композиция в составе метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите «9» апреля 2024 года (протокол заседания № 8) 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 государственный технический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (125047, Москва, Миусская площадь, 9, приказ о создании диссертационного совета от «28» сентября 2016 года №1172/нк).

Соискатель Лушников Алексей Валерьевич, «23» августа 1988 года рождения, в 2012 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Орловский государственный университет». В 2018 году освоил программу подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный аграрный университет». С 2013 года по 2019 год работал в должности научного сотрудника, с 2017 года по настоящее время – в должности главного специалиста центра коллективного пользования «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация выполнена в Орловском государственном аграрном университете имени Н.В. Парахина Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат технических наук, доцент **Гнеушева Ирина Алексеевна**, доцент кафедры биотехнологии Орловского государственного аграрного университета имени Н.В. Парахина.

Официальные оппоненты:

**Шарова Наталья Юрьевна** – гражданка Российской Федерации, доктор технических наук, профессор Российской академии наук, заместитель директора по научной работе Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» Российской академии наук;

**Тремасова Анна Михайловна** – гражданка Российской Федерации, доктор биологических наук, заведующий отделением биотехнологии, ведущий научный сотрудник лаборатории ветеринарной биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Кемеровский государственный университет**» (Кемерово) в своем *положительном* отзыве, подписанном Асякиной Людмилой Константиновной, доктором технических наук, доцентом, профессором кафедры бионанотехнологии, указала, что диссертационная работа Лушников Алексея Валерьевича является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных соискателем исследований предложены новые научно обоснованные решения по созданию биопродукции лечебно-профилактической направленности, имеющие существенное значение для медицинской и ветеринарной биотехнологии.

Диссертация в полной мере удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в действующей редакции), а ее автор – Лушников Алексей Валерьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология (диссертационная работа обсуждена и одобрена на заседании кафедры бионанотехнологии «3» мая 2024 года, протокол № 11).

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

Соискатель имеет 63 опубликованных работы, в том числе по теме диссертации опубликована 21 работа, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 4 работы. **В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах.** Все работы опубликованы с соавторами, личный вклад соискателя составляет более 70% и заключается в сборе и анализе литературных данных, планировании и выполнении экспериментальных работ, обработке и анализе полученных результатов, участии в формировании выводов, написании и оформлении публикаций. Соискателем опубликовано 10 работ в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов, получено 4 патента, изданы 1 монография и 1 учебник, выполнено 1 федеральное патентное депонирование штамма.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

Гнеушева И.А., Лушников А.В., Коношина С.Н. Определение источника и подбор режима экстрагирования метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обладающих антибиотической активностью в отношении представителей группы *Enterobacteriaceae* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. Т.26, № 7. С. 20-25 (CAS)

Гнеушева И.А., Лушников А.В. Разработка показателей качества экстракта культуральной жидкости *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2023. Т. 26, № 12. С. 40-48 (CAS)

На диссертацию и автореферат поступило 7 отзывов, **все положительные**. В отзывах указывается, что представленная к защите диссертационная работа характеризуется высокой актуальностью, научной ценностью и имеет большое значение для теории и практики промышленной биотехнологии. Отзывы направлены:

1. Скиба Екатерина Анатольевна, доктор технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук. В отзыве приведены следующие замечания и вопросы: (1) «Из автореферата не ясно, планируется ли совместное культивирование *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus acidophilus*, в каком соотношении планируется смешивать экстракты *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434, *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus acidophilus*, сколько планируется вносить гидролизного лигнина и каким образом осуществлять иммобилизацию экстрактов на лигнине?»; (2) «Предложенный метод определения массовой доли экстракта *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 не убедителен, т.к. по оптической плотности раствора не возможно установить является он раствором экстракта *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 или раствором экстракта *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus acidophilus* или раствором других веществ»; (3) «Из автореферата не ясно, разработаны ли технические условия и технологическая инструкция на метабиотический препарат? Имеются ли акты внедрения разработанного препарата?».

2. Мирошниченко Ирина Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Федерального государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего образования «Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина». В отзыве имеется вопрос: «Анализ автореферата критических замечаний не вызвал, однако хочется, что бы автор внес ясность: когда оценивали эффективность предлагаемого метабιοтика, вы заменяли на него 1/10 суточного рациона. Укажите состав рациона. Можно ли гарантировать такие же результаты при кормлении другим составом или при увеличенной дозировке метабιοтика?».

3. Сафронова Оксана Викторовна, кандидат технических наук, доцент кафедры товароведения и таможенного дела Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева». В отзыве имеется замечание: «В качестве замечания хотелось бы отметить, что в автореферате на рисунке 12 представлено некачественное изображение».

4. Павленко Игорь Викторович, кандидат биологических наук, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности». Замечаний нет.

5. Мезенова Ольга Яковлевна, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой пищевой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Калининградский государственный технический университет». Замечаний нет.

6. Семенова Елена Федоровна, кандидат биологических наук, профессор кафедры фармации Института биохимических технологий, экологии и фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского». Замечаний нет.

7. Цугкиев Борис Георгиевич, доктор сельскохозяйственных наук, директор научно-исследовательского института биотехнологии, профессор кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Горский государственный аграрный университет», и Гагиева Лариса Черменовна, доктор биологических наук, доцент кафедры биотехнологии и стандартизации того же университета. Замечаний нет.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:** Предложен алгоритм получения экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и преобразование его в бактериостатическую композицию на водном растворе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. Установлено, что экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и его бактериостатическая композиция нетоксичны не вызывают аллергических реакций, селективно подавляют рост грамотрицательных микроорганизмов, увеличивают эффективность бета-лактамов антибиотиков и могут быть использованы в качестве компонента препаратов для коррекции микробиоценоза кишечника. Представлена технология производства препарата – метабιοтика для коррекции микробиоценоза кишечника, эффективность которого доказана экспериментально в опытах на лабораторных животных.

**Теоретическая значимость исследований обоснована тем, что:**

Изучены морфологические, культуральные, биохимические свойства, произведена молекулярно-биологическая идентификация, определен состав оригинальной питательной среды и оптимизированы условия культивирования штамма *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Детально проработан способ получения экстракта культуральной жидкости *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обладающего бактериостатической активностью, изучены его физико-химические и биологические свойства, установлен спектр антибиотической активности и значения минимальных концентраций экстракта ингибирующих рост чувствительных микроорганизмов.

На основании экстракта культуральной жидкости *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 сконструирована бактериостатическая композиция, вошедшая в состав метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника. Получены экспериментальные данные об изменении состава кишечного микробиома при пероральном введении предлагаемого метабиотика.

**Значение полученных соискателем результатов исследований для практики подтверждается тем, что:**

Штамм *Trichoderma harzianum* Rifai Б/л 14 депонирован в Биоресурсный Центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика как *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Разработана принципиальная технологическая схема, которая может быть использована для организации производства метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника, включающая следующие стадии: получение бактериостатической композиции на основе экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (в качестве антибактериальных агентов против грамотрицательных бактерий кишечной группы); получение экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ (в качестве стимулятора роста индигенной микробиоты кишечника); получение энтеросорбента (в качестве носителя БАВ); приготовление метабиотика (объединение компонентов и получение готовой формы препарата).

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

- выводы диссертации обоснованы и соответствуют поставленным задачам, не вызывают сомнения и согласуются с современными подходами к выбору объектов и методов исследования;

- достоверность полученных результатов обеспечена использованием методик эксперимента, соответствующих современному научному уровню, и подтверждена их последовательностью и согласованностью;

- результаты получены с привлечением аккредитованных лабораторий, использующих сертифицированное оборудование, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях;

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

**Личный вклад соискателя состоит** во включенном участии на всех этапах процесса, непосредственном участии в постановке основных задач исследования, получении исходных данных, проведении всех экспериментов, обработке и

интерпретации экспериментальных данных, разработке основных методов эксперимента, экспериментальных стендов и установок, личном участии в апробации результатов исследования, подготовке основных публикаций по выполненной работе.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Как можно математическим моделированием получить экстракт? Как Вы объясните увеличение энергии активации? Как получали кривые температурной зависимости энергии активации? Сколько температур использовали для опыта?

2. Основные результаты выражены с точностью до второго знака, а средняя квадратичная ошибка колеблется от 0,5 до 0,9 – имеет ли смысл приводить данные до второго знака? При обработке результатов Вы использовали линеаризацию Лайнуивера-Берка – проверяли ли условия, при которых это возможно?

3. Вы находите точку пересечения кривых, при этом кривые у Вас масштабированы – но они же по разным осям с разными единицами измерения?

4. Вы проводили экстракцию этилацетатом? Выполняли ли токсикологические исследования порошка? Могут ли остатки этилацетата оказывать токсическое действие?

5. Как Вы проверяли, что этилацетат практически полностью удаляется при лиофильной сушке?

6. Проверяли ли воздействие этилацетата на культуру? Как с этим соотносятся данные о МИК Ваших экстрактов?

7. Токсичны ли сама культура и те компоненты этой культуры, которые не экстрагируются? Имеет ли смысл операция экстракции, может быть, целесообразно высушить и измельчить саму культуру? Вы говорите о методике определения количества экстракта – на чём основана эта методика?

8. Впервые обосновано применение биологически активных соединений гриба – каких именно? Есть вещества, продуцируемые организмом – это одна группа биологически активных веществ, и есть другая группа, синтезируемая грибами. Что именно используется?

9. Поясните приготовление на стадии сушки: у Вас одна часть бактериостатической композиции, две части экстракта и 30 частей энтеросорбента. Может ли влиять природа этого энтеросорбента? И что это за энтеросорбент?

10. Поясните подробнее, какова теоретическая значимость Вашей работы? Энтеросорбент – это промежуточный или конечный этап?

11. Можете ли Вы оценить стоимость Вашего продукта?

Соискатель Лушников А.В. ответил на вопросы, заданные в ходе заседания, и привел собственную аргументацию.

**На первый вопрос автор пояснил**, что использована не совсем корректная формулировка. Речь идет не о получении экстракта, а о подборе условий его получения. Сам процесс пропорционален изменению константы скорости, при разных температурах получали различные значения энергии активации. Зависимость энергии активации изучали в интервале температур от 18 до 43 °С, шаг 5 °С. По полученным данным строили кривые, которые затем линеаризовали логарифмированием. Температуру 31 °С определили по пересечению линеаризованных функций.

**Со вторым вопросом автор согласился**, отметив избыточную точность представления данных.

**На третий вопрос автор пояснил**, что полученные кривые сопоставляли по шкале температуры, несмотря на то, что у данных разные размерности. Кривые специально приводили в линейный формат, чтобы найти пересечение по шкале температуры.

**На четвертый вопрос автор пояснил**, что этилацетат удаляется при концентрировании экстракта. Кроме того, после концентрирования экстракт подвергали лиофильной сушке, где этилацетат практически полностью удаляется из препарата.

**На пятый вопрос автор пояснил**, что хотя качественных реакций на этилацетат не делали, но данное вещество имеет настолько сильный и специфический запах, что даже в самых маленьких концентрациях легко определяется органолептически.

**На шестой вопрос автор ответил**, что препараты проверяли на животных, и те концентрации этилацетата, которые достигнуты после выпаривания и после лиофилизации, нетоксичны для животных. Поэтому можно говорить о его минимальных следах.

**На седьмой вопрос автор ответил**, что неэкстрагированные продукты не проверяли, делали анализ только экстракта. Биомасса обладает ростостимулирующими свойствами, однако включать этот факт в диссертацию посчитали нецелесообразным. В основу методики положено спектрофотометрическое определение: исследуется готовая биопродукция, в которой заведомо известно количество экстракта и, ожидаемо, нет никаких маскирующих веществ при данных условиях определения. После операций экстракции, сушки и стандартизации получают рабочий раствор, по которому делают разведение и уже на спектрофотометре в соответствующих условиях определяют массовую долю. Это подтверждено и сторонней лабораторией.

**На восьмой вопрос автор ответил**, что в рамках данной работы рассматривались экзометаболиты, полученные из культуральной жидкости. Впервые они раскрываются, потому что до 2015 года *Trichoderma atroviride* не публиковался как таковой, о нем была только одна единственная статья-классификатор, этот штамм – по сути, новый.

**На девятый вопрос автор ответил**, что энтеросорбент – это лигнин. Очень хороший энтеросорбент, используется при производстве активированного угля, его можно не только использовать из-за сорбирующих свойств, но и применять в качестве носителя.

**На десятый вопрос автор уточнил**, что в диссертации данный штамм описывается впервые, это важный аспект теоретической значимости работы. Новизна разработанной методики состоит в том, что для неописанной ранее культуры подобрали условия экстрагирования веществ, у которых доказали бактериостатическую эффективность. Сами вещества не выделяли в чистом виде, такой задачи не было, тем не менее, удалось получить экстракт и доказать его эффективность. Энтеросорбент – это промежуточный этап, его доводят до состояния, на котором будет максимальная сорбция экстрактов: диспергируют в

растворе карбоксиметилцеллюлозы и далее обрабатывают ферментом целлюлазой, чтобы получить открытые гидроксильные группы, на которые будут более эффективно садиться препараты.

**На одиннадцатый вопрос автор ответил**, что разработанный препарат в 8 раз дешевле, чем коммерческий аналог «Симбиолакт» при в 1,6 раз большей эффективности. Разовая доза в период написания работы стоила 3,8 руб., цены текущего года не отслеживали.

На заседании «11» июня 2024 года диссертационный совет за новые научно обоснованные технические и технологические решения по разработке технологических основ микробного синтеза биологически активных метаболитов, обладающих бактериостатической активностью, и технологии производства метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника, имеющие существенное значение для промышленной, медицинской и ветеринарной биотехнологии, принял решение присудить Лушникову Алексею Валерьевичу ученую степень кандидата технических 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 специальности 1.5.6. Биотехнология по направлению исследования 3. «Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения».

Результаты работы могут быть рекомендованы для внедрения в научных организациях и на предприятиях, где ведутся исследования в области изыскания новых микроорганизмов-продуцентов и разработки технологий биологически активных веществ, обладающих антибактериальным и/или антифунгальным действием.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 15 докторов наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» – 16 (шестнадцать), против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель  
диссертационного совета

Виктор Иванович Панфилов

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Ирина Васильевна Шакир



11 июня 2024 года