

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Дин Фаня на тему: «Морфология, физиология и микробиом кефирных зёрен разного происхождения» по специальностям  
1.5.11. Микробиология (биологические науки) и  
1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

### Актуальность

Исследование микробиологии кефирных зерен можно разбить на несколько этапов: 1) описание кефирных зёрен и полезных свойств кефира, 2) попытки выделить чистые культуры микроорганизмов и описать их ассоциации, 3) искусственно получить кефирный «грибок» и продукт – кефир.

Начало исследования кефирных зёрен относится к 1860-м годам, спустя почти 20 лет Э. Керн впервые описал в кефирных зёрнах два микроорганизма: бактерию *Dispora caucasica* и дрожжи аналогичные *Saccharomyces cerevisiae*. С тех пор многочисленные исследователи публиковали свои данные о микробном населении кефирных зёрен, иногда эти данные подтверждали друг друга, но часто имели место быть сильные расхождения. Параллельно с исследованием микробиологии кефирных зерен шли работы и по химии, было установлено, что в кефире идут два типа брожения: молочнокислое и спиртовое. К началу 19 века исследователи кефира пришли к выводам, что кефирное зерно – ассоциация разных групп микроорганизмов – дрожжей и бактерий, симбиотические взаимоотношения между которыми формируют уникальные физиологические свойства кефирного зерна, что состав микробного населения кефирных зерен может несколько различаться, а также что бывают «здоровые» и «больные» кефирные зёрна. К 1895 году Н. Есауловым были сделаны попытки искусственно получить кефирные зёрна из чистых культур микроорганизмов, а также сформировались некоторые представления, какое положение в кефирном зерне занимает тот или иной микроб. Однако попытки формирования кефирных зёрен в лабораторных условиях долгое время были безуспешными. По этой причине в начале 20 века исследователи всё чаще стали возвращаться к «начальным» этапам исследования: описание строения кефирных зерен и исследования его микробного населения. В это время появляется все больше

и больше различных вариантов выявленных микробных «композиций», которые во много определяются регионами происхождения кефирных зерен, детально описываются и сравниваются дрожжевые и бактериальные компоненты и их физиологические характеристики. В 1930-1950е годы многочисленные попытки сделать кефирное зерно в лабораторных условиях так и не увенчались успехом, готовый продукт на искусственном зерне был далек от идеала. К настоящему времени ситуация изменилась мало.

В настоящее время работы по исследованию кефира и кефирного зерна не теряют своей актуальности. Например, достаточно обратиться к индексации статей в базе PubMed – число таких работ уже более 1000, и в последние годы идет экспоненциальный рост их количества. Исследователи насчитывают более 50 различных микроорганизмов, которые могут участвовать в формировании кефирного зерна. Многие из бактерий являются сложно культивируемыми, и их выявление стало возможным только с использованием современных методов высокопроизводительного секвенирования. В промышленных масштабах кефирные зёрна редко используются из-за их медленного роста, сложности применения, плохой воспроизводимости и высокой стоимости. Вместо этого применяются смеси определенных молочнокислых бактерий и дрожжей, но готовый продукт по своим свойствам и характеристикам часто уступает в сравнении с натуральным кефиром на основе зерна. Попытки синтезировать стабильное кефирное зерно *de novo* со всеми свойствами природного малоэффективны. К настоящему времени исследователи раз за разом проходят 3 этапа, обозначенные в 1958 году Е.П. Феофиловой.

Таким образом, работа Дин Фаня является актуальным исследованием, дополняющим микробиологические исследования кефирных зёрен, начатые почти полтора века тому назад.

### **Научная новизна**

Обозначенная в диссертации новизна: «Впервые с помощью высокопроизводительного секвенирования генома показано филогенетическое разнообразие микроорганизмов в микробиоме кефирных зёрен из разных территориальных зон их исторического происхождения (Кавказ, Тибет и Россия),

установлены их отличия по бактериальному и дрожжевому составу», к сожалению, не очень удачно сформулирована. В настоящее время уже известны другие работы по характеристике микробного населения кефирных зёрен обозначенных регионов с помощью высокопроизводительного секвенирования, например работы:

Wang H et al. Autogenic successions of bacteria and fungi in kefir grains from different origins when sub-cultured in goat milk. *Food Res Int.* 2020; 138(Pt B):109784. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109784.

Kochetkova TV et al. Microbial Communities of Artisanal Fermented Milk Products from Russia. *Microorganisms.* 2022; 10(11):2140. doi: 10.3390/microorganisms10112140.

Sindi A et al. Bacterial Populations in International Artisanal Kefirs. *Microorganisms.* 2020; 8(9):1318. doi: 10.3390/microorganisms8091318.

Zeng X et al. Metagenomic analysis of microflora structure and functional capacity in probiotic Tibetan kefir grains. *Food Res Int.* 2022 Jan; 151:110849. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110849.

Du G et al. Microbial community diversity associated with Tibetan kefir grains and its detoxification of Ochratoxin A during fermentation. *Food Microbiol.* 2021; 99:103803. doi: 10.1016/j.fm.2021.103803.

Однако, как было указано в многочисленных исследованиях, характеристика кефирного зерна разного происхождения (даже из одного и того же региона) часто является уникальной. Поэтому, автору необходимо было более конкретно указать в Новизне объекты своего исследования, избегая обобщения с обозначением только регионов. Кроме того, несомненный интерес представляет исследованные автором биотехнологические характеристики кефирных зёрен, которые можно рекомендовать более широко использовать для оценки пробиотических свойств кефирного зерна.

### **Научная и практическая значимость**

Результаты, полученные в работе Дин Фаня, представляют несомненный интерес для микробиологии и биотехнологии. В работе изучены биотехнологические характеристики кефира, приготовленного на кефирных зёрнах из разных регионов, такие как скорость увеличения биомассы закваски, антимикробный спектр

воздействия на разные таксономические группы микроорганизмов, изучены пробиотические характеристики выделенных культур. Показаны условия получения кефирных зёрен в стадии роста, что может служить рекомендацией при разработке биотехнологии производства кефиров на их основе. С использованием высокопроизводительного секвенирования генов рРНК проанализированы и сравнены микробиомы кефирных зёрен, отобранные в трёх регионах. Все полученные данные помогут в стандартизации кефирных заквасок и продуктов. Выделены культуры бактерий и дрожжей из кефирных зёрен, которые пополнили коллекцию кафедры микробиологии, теперь доступны для дальнейшего изучения.

### **Результаты исследования**

Результаты проведенного исследования изложены в 10 разделах, также имеется раздел с обсуждением полученных результатов. Все поставленные задачи исследования выполнены. Кефирные зёрна были детально изучены, используя как классические методы микробиологии, так и самые современные методы высокопроизводительного секвенирования. Получены детальные данные по отличительным особенностям микробного населения кефирных зёрен разного происхождения. Дана характеристика пробиотических свойств кефирных зёрен и чистых культур микроорганизмов.

По теме диссертации автором были опубликованы 4 статьи в журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Положения работы и результаты исследований были представлены на международных и всероссийских конференциях.

Работа Дин Фаня является целостным исследованием с практической и фундаментальной значимостью. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

### **Замечания и вопросы**

К работе есть несколько замечаний и вопросов.

- Обзор литературы по теме исследования не отражает полноты накопленных знаний по таксономическому разнообразию микроорганизмов кефирных зёрен разных регионов происхождения. Таблицы 1 и 2 включают очень ограниченный набор

известных данных с самыми свежими результатами от 2016 года.

- В разделе «Объекты исследования» нет детальной информации о происхождении кефирных зёрен. Только в последующих главах появляется скудная информация о некоторых кефирных зёрнах: Северная Осетия, кустарное производство из Москвы.
- В разделе 3.2 указано «Количество молочнокислых бактерий в кефирах, изготовленных на всех образцах КЗ, было не менее  $10^7$  КОЕ/г, а дрожжей - не менее  $10^4$  КОЕ/г.», однако детальные количественные характеристики для кефирных зёрен не приводятся.
- Нет обсуждения результатов, почему выделенные дрожжи не выявились при высокопроизводительном секвенировании.
- Замечена неточность в выводе №3. *Galactomyces candidus* ранее обнаруживался в кефирных зернах. В табл. 2 этот вид неоднократно фигурирует как *Geotrichum candidum* (обозначение анаморфы вида).
- Некорректно переносить результаты антагонизма против конкретного штамма *Candida albicans* на весь род *Candida* (в заключении и в выводах), который включает почти 300 видов дрожжей.

Имеет место некоторая небрежность в оформлении работы.

- В тексте работы много опечаток.
- Не везде курсивятся латинские названия микроорганизмов.
- Нет подписи к рисунку 4.
- Про гидрофобность *G. candidus* написано в разделе про бактерии (стр. 99).
- На стр. 99 и 101 замечены повторы текста.
- На стр. 100 упоминаются дрожжи класса *Agaricomycetes* для кефирного зерна Т-2-3, но в табл. 10 нет этого класса.

### **Заключение**

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования Дин Фаня на тему: «Морфология, физиология и микробиом кефирных зёрен разного происхождения». Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11.

Микробиология (биологические науки) и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Дин Фань заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология (биологические науки) и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:

к.б.н., в.н.с. лаборатории почвенной микробиологии  
кафедры биологии почв факультета почвоведения  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»  
Качалкин Алексей Владимирович

02.05.2023

Контактные данные:

тел.: +7(495)9393603, e-mail: kach

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена диссертация:

03.02.03 микробиология (биологические науки)

03.02.08 экология (биологические науки)

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12,  
факультет почвоведения МГУ, кафедра биологии почв.

Тел.: +7(495) 939-29-47; e-mail: soil.msu@mail.ru

Подпись сотрудника

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени  
М.В.Ломоносова» факультет почвоведения, каф. биологии почв  
А.В. Качалкина удостоверяю:

Ученый секретарь факультета почвоведения МГУ

Ю.А. Микулина