

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Дин Фань «Морфология, физиология и микробиом кефирных зёрен разного происхождения», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Наиболее устойчивой, метаболически активной формой существования микроорганизмов в природе и используемых в ряде техногенных систем, являются эволюционно сложившиеся микробные сообщества. Исследования закономерностей формирования и функционирования таких микробных сообществ является одним из приоритетных направлений исследований в области микробиологии, биотехнологии и экобиотехнологии.

Одной из таких ассоциативных культур микроорганизмов являются кефирные зёрна (КЗ), используемые человеком с древних времён для внесезонного сохранения молока, получения ценного питательного молочнокислого продукта кефира, который широко используется и в настоящее время получается как в домашних, так и в производственных условиях. Спрос на кефир в последние годы значительно вырос во многих странах мира в связи с актуальностью проблемы разработки методов рационального использования технологического потенциала микроорганизмов в решении проблем рационального здорового питания человека, кормления животных, получения лечебно-профилактических средств и др.

Исследования микробного состава кефира, взаимоотношения микробных компонентов кефирных зёрен с целью разработки технологии повышения продуктивности производства, повышения качества кефира, его свойств как продукта питания, лечебно-профилактических свойств, пробиотических свойств, повышения антимикробного спектра действия и др. является предметом активных исследований. Однако, до настоящего времени не определены закономерности разнообразия доминирующих форм молочнокислых бактерий и дрожжей в КЗ, используемых в разных регионах. Известно, что основная роль в превращении сообщества микроорганизмов в систему, действующую как единое целое, принадлежит трофическим взаимоотношениям. Однако, помимо трофических, отношения микроорганизмов в сообществе также регулируются и такими свойствами микроорганизмов, как способность к адгезии и сорбции, средство к субстрату, потребность к факторам роста и др.

Тема диссертационной работы Дин Фаня находится в рамках решения данной актуальной проблемы, Конкретно работа посвящена сравнительному изучению морфологии, физиологии и микробному составу лиофилизированных образцов кефирных зёрен, используемых для получения кефира в домашних хозяйствах в разных регионах: г.Москва , Китай (Тибет) и Осетия.

Научная новизна работы, *достоверность* полученных результатов и их *практическая значимость* определяются проведённой диссертантом сравнительной оценкой исследованных кефирных зёрен при использовании современных электронно микроскопических методов исследований, их структуры и молекулярно- генетических методов исследований их микробного состава. и определения технологических свойств кефира при использовании классических методов:

Научная новизна работы:

-подтверждены различия кефирных зёрен, по разнообразию содержащихся бактерий и дрожжей при сходстве их структуры, обеспечивающих получение кефира стандартного качества;

- подтверждено, что основными компонентами микробиома КЗ являются молочнокислые бактерии (*p.Lactobacillus* , *p.Lactococcus* и *p.Leuconostoc*). и впервые показано достаточно высокое (10-18%) содержание бактерий других родов.

-впервые определено присутствие дрожжей *p. Kazachstania* во всех образцах исследуемых кефирных зёрен, при их доминировании до88% в кефирных зёрнах (Ос) и (Тибет)и высокое содержание в кефирных зёрнах(М) дрожжей *Kluuveromyces maxinus*/до 40%

Практическая значимость работы:

-при изучении биотехнологических характеристик исследуемых образцов кефирных зёрен и выделенных чистых культур показаны штаммовые различия образования биоплёнки, обладания гидрофобными поверхностями, что определяет пробиотические свойства кефира;

-полученные в работе результаты изучения технологических свойств кефира и состава микробиоты кефирных зёрен определяет необходимость при разработке способов создания экспериментальных высокотехнологичных кефирных зёрен учитывать штаммовые различия антимикробного действия,

пробиотических свойств, способность к плёнкообразованию культур микроорганизмов.

Основные результаты работы были представлены на 4-х международных и всероссийских конференциях(2019г., 2022и 2023гг).

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 139 страницах, иллюстрирована 12 таблицами и 20 рисунками. Работа содержит введение, в котором оценивается актуальность темы работы и степень её разработанности; обзор литературы, материалы и методы; результаты и их обсуждение; заключение , выводы, список литературы.

Обзор литературы. На 48 страницах представлен обстоятельный анализ зарубежной и отечественной литературы, который охватывает : исторические аспекты использования кефира человеком, подробный анализ результатов исследований структуры и микробного состава кефирных зёрен, проведенных в разных регионах в настоящее время, что подтверждает большое сходство КЗ, используемых в разных регионах, и большое разнообразие молочнокислых бактерий и дрожжей в составе КЗ., что иллюстрируется в двух таблицах. Обсуждаются методические трудности определения разнообразия бактерий и дрожжей в кефирных зёрнах, результаты исследований закономерности взаимодействия бактерий и дрожжей в формировании структуры КЗ, структура и роль кефирана, пробиотические свойства кефира, получение и сохранение КЗ, анализируются используемые производственные технологии получения кефира. Обосновывается целесообразность использования современных молекулярно-генетических методов идентификации микроорганизмов для более глубокого анализа состава молочнокислых бактерий и дрожжей, что может быть использовано для отбора или формирования КЗ с повышенной функциональной активностью. Представленный обзор литературы заслуживает высокой оценки.

На основании проведенного анализа литературы диссертантом определены основные задачи работы.

Глава2. Материалы и методы исследований представлены на 16 стр. Для сравнительной оценки структуры, состава микробиоты трёх лиофилизированных образцов КЗ, используемых в домашних хозяйствах в разных географических зонах: Московский округ (М) , Китай (Тибет) и Северная Осетия (О) использован широкий спектр методов: микроскопия в светлом поле, электронная микроскопия; классические микробиологические

методы выделения чистых культур микроорганизмов, определения их антимикробного действия. Используются методы периодического культивирования кефирных зёрен в аэробных и анаэробных условиях, методы определения гидрофобности поверхности клеток, способности образовывать плёнки, пробиотические свойства и др.

Для анализа сложного микробного сообщества КЗ используются современные методы молекулярно-генетических исследований, высокопроизводительного секвенирования: секвенирования гена, кодирующего синтез 16S рРНК с бактериальными праймерами и с праймерами на область ITS1 комплекса –18S рРНК для дрожжей, что свидетельствует о достоверности полученных результатов..

Глава 3. Результаты исследований. На основании исследований **морфологии КЗ** при использовании сканирующей ЭМ показан тесный контакт дрожжей и бактерий в КЗ и их пространственное распределение. Расположение дрожжей вблизи поверхности зерна, (документировано фотографиями), связывается соискателем с облигатной зависимостью дрожжей от кислорода. Показана сходная структура всех исследованных образцов КЗ.

При исследовании **роста кефирных зёрен** на основании определения увеличения прироста их массы в зависимости от времени культивирования в молоке не выявлено различий показателей роста исследуемых КЗ, различий качества полученного в опыте кефира при их использовании, который соответствовал требованиям стандарта по органолептическим и физико-химическим показателям.

При определении **антимикробного действия полученного кефира** по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* была показана различная их антимикробная активность (по отношению к наиболее активному образцу московского региона) в пределах 20-30%. Выявлена фунгицидная активность всех исследованных образцов КЗ против аспергиллов и дрожжей *p.Candida albicans*. При этом показано, что фунгицидная активность исследуемых КЗ на 20-30% отличалась от максимальной фунгицидной активности, определённой для КЗ(Т).

Большой объём исследований проведен диссертантом **по изучению состава бактерий и дрожжей в образцах КЗ**. При использовании молекулярно-генетических методов было подтверждено ранее отмечавшееся разнообразие молочнокислых бактерий и дрожжей в КЗ. Так в КЗ (О и Т) до 90%

популяции дрожжей составляли дрожжи р. *Kazachstania*, а в КЗ (М) эти дрожжи составляли только 55%, а 45% составляли дрожжи р. *Kluyveromyces*. В КЗ также определено присутствие дрожжей *Pichia fermentans* (КЗ М); *Yarrowia lipolytica* (КЗ Т) и дрожжи *Gajactomyces candidus* (КЗ О), присутствие которых в составе микробиома кефирных зёрен ранее не было описано. Показано присутствие в исследованных КЗ из разных регионов микроорганизмов р. *Leuconostoc*, синтезирующих экзополисахариды, образующие плёнки.

На основании проведенных исследований КЗ разных регионов диссертантом выделены чистые культуры молочнокислых бактерий и дрожжей. Исследования **гидрофобности** выделенных молочнокислых бактерий показали большие различия по степени гидрофобности разных штаммов определённых видов бактерий, от 12% до 54%.

При определении способности компонентов КЗ **к образованию биоплёнок** показаны большие различия выделенных культур дрожжей *Pichia fermentans* по данному свойству, а также показаны большие различия разных штаммов бактерий *Lactobacillus kefir*.

Результаты исследований показали **отсутствие прямой корреляции** между степенью гидрофобности клеток и способностью к образованию плёнок.

В заключении диссертантом обобщаются полученные результаты изучения микробного состава кефирных зёрен (КЗ), полученных в домашних хозяйствах Московского округа, в Китае (Тибет) и Северной Осетии, структуры КЗ, качества получаемого кефира, антимикробного действия кефира и др. Проводится сравнение биотехнологических свойств изучаемых кефирных зёрен и делается вывод о возможности их использования для получения кефира.

Выводы достоверны и отражают результаты выполненной работы.

Автореферат работы отвечает содержанию диссертации.

В списке литературы представлены ссылки на 103 источника, из них 87 на английском языке, 36 источников, опубликованных за последние 10 лет и 14 за последние 5 лет.

Принципиальных замечаний по работе нет. Однако необходимо высказать ряд замечаний, которые не снижают положительной оценки работы, и значимости проведенных исследований:

На основании выполненных исследований целесообразно было бы диссертанту предложить состав кефирных зёрен, при использовании выделенных культур микроорганизмов, обеспечивающие наиболее высокие биотехнологические свойства.

В целом диссертационная работа Дин Фань «Морфология, физиология и микробиом кефирных зёрен разного происхождения» по актуальности избранной темы, степени обоснованности положений выносимых на защиту, научных выводов, их достоверности и новизне отвечает требованиям, установленных Московским государственным университетом им. М.В.Ломоносова к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.11 микробиология и 1.5.6 Биотехнология(биологические науки), а также критериям, определенным пп.2.1-2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ им.М.В. Ломоносова. Работа оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук Московского государственного университета им.М.В.Ломоносова.

Соискатель Дин Фань заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 микробиология и 1.5.6 биотехнология.

Официальный оппонент: Градова Нина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биотехнология

ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический Университет имени Д.И.Менделеева»,

Градова Нина Борисовна,

Контактные данные

e-mail: gradov@

Док. диссертация защищена по спец. Микробиология

Адрес места работы: 125047 г. Москва, Миусская пл., д.9,

Тел раб. 81

Подпись *Н.Б.*
У В О С Т
У Ч Е Н Ы Й С Е К Р Е Т
Р Х И У

(И.К. Каминин)

