

**Отзыв официального оппонента на диссертацию на соискание ученой
степени кандидата биологических наук Дин Фаня
«Морфология, физиология и микробиом кефирных зерен
разного происхождения»
по специальности 1.5.11. Микробиология (по биологическим наукам)
1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам)**

Актуальность темы.

Кефир – это напиток, приготовленный из ферментированного молока. Он содержит молочнокислые бактерии и дрожжи, которые образуют кефирные зерна (КЗ), используемые в качестве кефирных заквасок. Считается, что среди кисломолочных продуктов кефир имеет преимущество для здоровья, включая улучшение пищеварения, укрепление иммунной системы и улучшение здоровья кожи.

В кишечнике кефир выступает как пробиотик, снижает риск развития инфекции, помогает при дисбактериозе, снижает рост болезнетворных микробов. Кефир широко используется в народной медицине. Он повышает защитные силы организма, его рекомендуется пить больным не только с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, но и страдающим малокровием, хроническими инфекционными заболеваниями и даже болеющим СПИДом. Кефир включают в рацион питания при нарушениях сна, при невротических состояниях, синдроме хронической усталости.

Культуре этого гриба уже многие сотни лет. Имеется несколько версий его происхождения. В Тибете буддийские монахи сквашивали молоко в глиняных горшочках. Среди мусульман кефирный гриб считался подарком от Аллаха и передавался от поколения к поколению. Процесс приготовления кефира хранился в строгом секрете.

По другой версии принято считать, что родиной кефира является Северная Осетия. Согласно легенде, кефирные грибки принес в своем посохе в дар горцам сам Пророк Мухаммед, когда он проходил через эти территории почти полторы тысячи лет назад. Гриб называли даром Аллаха, зерном

Пророка Мухаммеда. Поэтому он передавался, как реликвия, из поколения в поколение. Мусульмане считали грибок основой семейного богатства и благополучия, поэтому о процессе приготовления кефира никому не рассказывали, храня его в секрете. Его не передавали, не дарили и не продавали. Это считалось грехом, лишаящим грибок его целебной силы.

Первая научная статья о кефире в России была написана в 1867 году. Один из русских медицинских журналов описывал лечебные и питательные свойства напитка. В самом начале XX века Всероссийское общество врачей предложило московскому молокозаводчику Бландову достать рецепт приготовления кефира и наладить его производство в России. Через год он сумел получить кефирные грибки из Северной Осетии и открыл первый в мире завод по производству кефира. Именно от семейства этого кефирного зерна происходит теперь весь кефир в России. Свое распространение по России кефир начал в 1909 году.

В настоящее время кефир в России составляет 35% всех производящихся кисломолочных продуктов. Изучение состава и структуры природных кефирных заквасок имеет по-прежнему актуальное значение в связи со стремлением людей к здоровому образу жизни, здоровому питанию, активному долголетию, и важной роли в этом высокоэффективных кисломолочных продуктов. Разработка научно обоснованных заквасок с наибольшей биологической активностью является современным востребованным направлением.

Научная новизна и значимость работы. Соискателем проведены исследования кефирных зерен древнейшего происхождения. Впервые было проведено сравнение структуры, состава и свойств уникальных природных кефирных зерен, сохраняющихся людьми до настоящего времени - из Тибета (Китай), Кавказа (Осетия) и из Москвы. Причем, судя по историческим документам, московские кефирные зерна привезены с северного Кавказа всего около 115 лет тому назад, и возраст их происхождения насчитывает тысячелетия. С помощью электронно-микроскопических исследований Дин Фанем показана единая структурная организация кефирных зерен заквасок из

трех территориально различных мест их поддержания, и при этом отмечено как сходство, так и различия в филогенетическом разнообразии микроорганизмов в микробиоме кефирных зерен. При сравнении дрожжевого состава установлено, что у всех КЗ присутствуют дрожжи *Kazachstania turicensis* и *Kazachstania unispora*, составляя суммарно 55-98% независимо от места их происхождения, что может свидетельствовать о едином предке для всех трех вариантов кефирных зерен, возможно из Центральной Азии, где широко используются напитки на основе ферментации дрожжами и лактобактериями молока: коровьего, козьего, кобыльего и даже верблюжьего (кумыс, айран, тан, катык). Но КЗ из Китая (Тибета) и Москвы содержат также и *Kluyveromyces marxianus*, что указывает на возможное отдаленное родство кефирных зерен Тибета и Москвы. Это дополнительно подтверждает факт выделения из кефирного зерна Северного Кавказа (Осетии) дрожжей *Galactomyces candidus*, не встречающихся в кефирных зернах других территорий, что свидетельствует о более обособленном положении осетинских кефирных зерен.

Дин Фань изучил микробиомы кефирных зёрен различного происхождения, впервые используя высокопроизводительное секвенирование генома. Полученные результаты филогенетического разнообразия кефирных зерен позволили не только предположить родственные связи и происхождение кефирных зерен, но и трофические взаимодействия симбионтных микроорганизмов из разных структурных частей зерна.

Соискателем получены новые данные об антиинфекционных свойствах кефирных зерен, и что особенно ценно – выявлены кефирные зерна, способные подавлять кандиду и аспергилл, что открывает перспективы создания продукта функционального питания для профилактики кандидозов и грибных инфекций.

Практическая значимость. Работа имеет выраженную практическую направленность. Получены биотехнологические характеристики изучаемых кефирных зерен. На основании совокупности показателей даны

рекомендации по использованию кефирных зерен образцов N5 и OS для производственных целей.

Соискателем выявлены активные штаммы пробиотических микроорганизмов, перспективные для практического использования в кисломолочных заквасках. К ним относятся выделенные автором из образцов кефирного зерна Осетии и Московского региона чистые культуры лактобактерий, идентифицированные как *Lactobacillus kefir*, а из КЗ Тибета - *Lactobacillus casei*.

Структура диссертация логична и включает все стадии научно-исследовательской работы, начиная от постановки задачи, использования как классических, так и самых современных методов исследования, а также оценки перспективности практического использования наиболее активных кефирных заквасок. Диссертация традиционно состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Содержит 139 страниц, 12 таблиц, 20 рисунков. Список литературы включает 103 ссылки, из которых только 16 на русском языке.

В литературном обзоре приведены характеристики кефиrow, общие сведения об их бактериальном и дрожжевом составе. Интересен раздел, посвященный трофическим взаимодействиям между микробными компонентами. Представлена обобщенная соискателем схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен, сбраживающих и не сбраживающих лактозу. Описан промышленный процесс получения кефира.

Дин Фанем освоены современные методы исследования: выделение чистых культур, сканирующая электронная микроскопия, высокопроизводительное секвенирование гена 16S рНК с бактериальными праймерами и высокопроизводительное секвенирование дрожжей по участку ITS1, определение гидрофобности клеточной поверхности, способности к образованию биопленок.

К основным достижениям, полученным диссертантом, можно отнести выделение чистых природных культур бактерий и дрожжей, перспективных

для использования в качестве пробиотиков, определение антимикробного спектра действия кефиров, получение таких биотехнологических характеристик кефиров, как скорость роста, накопление биомассы, гидрофобность и способность штаммов, выделенных из исследованных образцов кефиров, к образованию биопленки.

По теме диссертации опубликованы 4 работы, в том числе 4 статей в журналах, индексируемых в базе данных WoS, SCOPUS, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Содержание автореферата соответствует основному содержанию диссертации.

Результаты научных исследований соответствуют специальности 1.5.11. Микробиология, и 1.5.6. Биотехнология, а именно следующим ее направлениям - биологические науки, в части 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.

По диссертационной работе имеются некоторые вопросы и замечания. В работе хотелось бы более глубокого обсуждения выявленных особенностей структурной организации кефирного зерна, а именно, нахождение дрожжей во внешних слоях кефирных зёрен, а не в середине в связи с присутствием спирта в кефире. Целесообразно было бы соискателю обсудить, какие виды микроорганизмов осуществляют спиртовое брожение в кефирном зерне.

Почему не удалось выделить ни одного представителя лактококков из изучаемых кефирных зерен, хотя по данным высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК с бактериальными праймерами показано, что лактококки составляют 34-46% от всех бактерий?

Следует отметить некоторую небрежность соискателя в отношении графического и табличного оформления полученных данных, особенно в подписях к рисункам и названиям вариантов в таблицах: рисунки 11, 12 в диссертации, 2, 4, 7, 8 в автореферате, таблицы 5, 12 в диссертации и 2, 4 в автореферате.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.11. Микробиология (по биологическим наукам) и 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам), 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 наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Дин Фань заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (по биологическим наукам) и 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам)

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

заведующая лабораторией инновационных технологий,

главный научный сотрудник ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

 Ушакова Нина Александровна

04.05.2023г.

Контактные данные:

тел.: 7(_____)_____, e-mail: naushakova@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.11. Микробиология, 1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Адрес места работы:

119071, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33,

ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова

РАН

Тел.: 84956330820; e-mail: naushakova@sev-in.ru

Подпись сотрудника ФГБУ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН Н.А. Ушаковой удостоверяю:

Зам. директора



К. Б. Гонгальский

