

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора технических наук
Волковой Галины Сергеевны на диссертационную работу
**Нестеровой Екатерины Юрьевны «Комплексные исследования состава
пробиотических продуктов и заквасок с применением
высокопроизводительного секвенирования и целевых ПЦР-методов»**,
представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по
специальности 2.7.1 – Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и
биологически активных веществ

Актуальность темы диссертационной работы

В настоящее время контроль качества и микробиологического состава пробиотических пищевых продуктов и заквасок является приоритетным направлением научных исследований. Технология секвенирования последнего поколения в комплексе с методами биоинформатики позволяет проводить анализ генома микробных популяций в кратчайшие сроки и на современном уровне. Поэтому чрезвычайно перспективно внедрение этой технологии в практику с целью оценки качества и таксономического состава промышленных заквасок, ферментированных продуктов питания и биологически активных добавок к пище, содержащих пробиотики.

Соотношение штаммов и состав бактериальных консорциумов напрямую влияют на органолептические свойства кисломолочных продуктов и профилактические эффекты, возникающие при их употреблении. Нарушение баланса бактериального состава заквасок или пробиотиков может привести к снижению их эффективности. Поскольку классические микробиологические методы зачастую трудоемки и неточны, внедрение методов молекулярной генетики позволит перевести контроль качества на новый уровень. В настоящее время с помощью высокопроизводительного секвенирования и ПЦР-методов, помимо непосредственного повышения точности идентификации микроорганизмов, стало возможно изучение функционального потенциала и механизма действия бактерий.

Все вышеизложенное подтверждает актуальность проведения исследований состава пробиотических продуктов и заквасок с применением

высокопроизводительного секвенирования и целевых ПЦР-методов, перспективных для внедрения в методическую базу контроля соответствующих производств.

Научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений.

Автором впервые с помощью высокопроизводительного секвенирования установлено изменение полного бактериального состава молочной основы в процессе ферментации, показано вытеснение в динамике бактерий рода *Bifidobacterium* за счет увеличения относительного количества бактерий рода *Lactobacillus*, что может быть положено в основу контроля заквасок и пробиотических пищевых продуктов на основе ассоциаций *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*.

Автором разработан и запатентован оригинальный способ идентификации на основе ПЦР-ПДРФ значимых для производства заквасок и пробиотиков лактобактерий и бифидобактерий.

Показано, что виды *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus* и *L. brevis* могут быть надежно идентифицированы на основе использования трёх рестриктаз – Alu I, AspLE I и Msp I с предварительной амплификацией ДНК с помощью праймеров 337F и 1100R. Виды *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* и *B. animalis* могут быть идентифицированы на основе использования четырех рестриктаз – AsuHP I, BstHH I, Sse9 I и Taq I также с предварительной амплификацией ДНК с помощью праймеров 337F и 1100R.

Новизна технических решений подтверждена патентом РФ «Способ идентификации значимых для пищевой промышленности 5 представителей рода *Lactobacillus* – *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus* и *L. brevis* на основе рестрикционного анализа гена 16S рРНК» (№ 2842962).

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций диссертанта

Представленные в диссертационной работе результаты исследований имеют значимость для науки и производства, заключающуюся в теоретическом обосновании и практической реализации комплексных исследований состава

пробиотических продуктов и заквасок с применением высокопроизводительного секвенирования и целевых ПЦР-методов.

Получен патент РФ №2842962 на изобретение.

Использование высокопроизводительного секвенирования для контроля процессов ферментации при приготовлении пробиотических продуктов решает задачу оптимизации условий культивирования бактерий для получения конечного продукта с необходимыми характеристиками.

Внесен существенный вклад в осуществление контроля относительного содержания бактерий в заквасках и пробиотиках для получения пробиотических продуктов с необходимым балансом штаммов.

Внедрение метода на основе ПЦР-ПДРФ в молочное производство и производство биологически активных препаратов позволит проводить предварительную оценку таксономической принадлежности бактерий, входящих в состав используемых на производстве заквасок, а также значительно упростит и удешевит процесс идентификации.

Степень обоснованности и достоверности результатов исследований

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных инструментальных методов изучения объектов исследования, воспроизводимостью результатов экспериментальных работ. Экспериментальные данные подтверждены теоретическими положениями и с достаточной степенью точности согласуются с известными концепциями, апробированы и внедрены в промышленных условиях. Таким образом, результаты исследований, научные положения диссертации и выводы следует считать обоснованными и достоверными.

Апробация работы

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на многочисленных научных конференциях, в том числе международных.

Соответствие диссертации специальности

Диссертационная работа Нестеровой Е.Ю. по содержанию и результатам выполненных исследований соответствует паспорту специальности ВАК 2.7.1 «Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ».

Публикации результатов исследований

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ. Из них 3 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России; 3 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования; получен 1 патент РФ.

Соответствие автореферата основным положениям

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК при Минобрнауки России и полностью отражает содержание диссертации.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, главы с материалами и методами, экспериментальной части с обсуждениями, заключения, выводов, практических предложений, списка сокращений, списка литературных источников и приложения. Работа изложена на 128 страницах, иллюстрирована 22 рисунками и включает 10 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна, практическая и теоретическая значимость, сформулированы основные положения, выносящиеся на защиту.

В первой главе (обзоре литературы) подробно изложены современные представления о заквасках и их применении в пищевой промышленности, аспекты контроля качества и состава заквасок и пробиотиков молекулярно-генетическими методами, включая высокопроизводительное секвенирование.

Во второй главе рассмотрены объекты и методы исследования, использованные в работе. Подробно описаны протоколы выделения ДНК, проведения ПЦР, высокопроизводительного секвенирования и рестрикционного анализа, представлены таблицы с таксономическим составом коммерческих заквасок и пробиотиков.

В третьей главе изложены основные результаты и проведено их обсуждение. Этапы исследования расположены в главе в логичном порядке, отражены все необходимые для понимания экспериментов детали, глава не содержит лишней информации. Автор иллюстрирует результаты своих исследований рисунками и таблицами, что способствует лучшему восприятию информации.

Описан подбор метода выделения бактериальной ДНК с помощью сорбента на основе диоксида кремния. Приведены этапы разработки способов концентрирования продуктов ПЦР перед высокопроизводительным секвенированием.

Изучен таксономический состав и соотношение бактерий в пробиотиках с применением высокопроизводительного секвенирования и даны пояснения к результатам. Изложена работа по скринингу бактериального состава заквасочных культур с помощью высокопроизводительного секвенирования.

Изучена динамика бактериального состава молочной основы в процессе ферментации, проанализированы технологические свойства пробиотических заквасок.

Приведены экспериментальные данные по видовой идентификации молочнокислых и бифидобактерий на основе ПЦР-ПДРФ.

В конце диссертации приведено заключение, выводы, практические предложения, список сокращений, список использованной литературы и приложение, содержащее патент РФ.

Высоко оценивая результаты проведенных автором исследований, считаю нужным сделать несколько замечаний и задать следующие вопросы:

1. В обзоре литературы автор опирается практически полностью на зарубежные публикации. Считаю, что это не вполне обосновано.

2. В объектах исследования и во всей диссертации автор не указывает номера изучаемых штаммов, ограничиваясь родом и видом. Это делает результаты менее информативными.

3. Проводилась ли автором идентификация штаммов микроорганизмов, входящих в состав изучаемых коммерческих пробиотических препаратов и заквасок (табл. 1 и 2), или это информация производителя?

4. Какие селективные среды использовались при идентификации бифидобактерий при подсчете КОЕ (табл.4)?

5. В п.2.2.9 приведен метод исследования биохимических свойств молочнокислых заквасок – «протеолитическая активность», который нигде в работе не применен.

6. При работе следует учитывать существующую отечественную нормативную базу в области безопасности пищевых продуктов. В частности, на стр.15 приведены сведения о возможности использования в качестве пробиотиков бактерий рода *Enterococcus*, что не допускается по ТР ТС 021/2011, Приложение 7, п.1.7., на стр.16 - *Bacillus coagulans*.

7. Чем можно объяснить различие заявленного штаммового состава пробиотиков от установленного экспериментально (табл.2 на стр.37 и рис.10 на стр.62)? В частности, требуется пояснение в отношении пробиотика №1.

8. Разделы с результатами исследований (п.п. 3.1 - 3.3) содержат значительную долю описательной части из статей, которую можно опустить.

9. Какова перспектива использования разработанных ПЦР-ПДРФ методов идентификации видов молочнокислых и бифидобактерий в качестве метода контроля на действующих предприятиях? Где внедрены результаты диссертационной работы и какова экономическая эффективность?

10. В работе достаточно много опечаток в латинских названиях штаммов. Присутствуют странные термины «заквасочная смесь» (стр.94) и «пик обильности рода *Lactobacillus*» (стр.95), местами автор отступает от научного стиля изложения.

Сделанные замечания носят частный характер, являются дискуссионными и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Заключение по диссертации

Диссертация Нестеровой Екатерины Юрьевны «Комплексные исследования состава пробиотических продуктов и заквасок с применением высокопроизводительного секвенирования и целевых ПЦР-методов» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований фундаментального и прикладного характера изложены новые технические и биотехнологические знания в области изучения генетических и технологических характеристик заквасок для производства пробиотических продуктов, разработан способ молекулярно-генетической идентификации пробиотических культур и выводы по возможности его применения для оценки состава многокомпонентных заквасок и пробиотиков, имеющие существенное значение для развития научных основ и прикладных аспектов биотехнологии и пищевой промышленности.

Таким образом, диссертационная работа, представленная к защите Нестеровой Е.Ю., удовлетворяет всем критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 в действующей редакции, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1. Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ.

Официальный оппонент:

Доктор технических наук по специальности
03.01.06 – Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии), заведующий отделом
биотехнологии ферментов, дрожжей, органических
кислот и биологически активных добавок

Волкова
Галина Сергеевна

24 ноября 2025 года.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии
– филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности
пищи.

Адрес организации: 111033, г. Москва, Самозванская, д.46

Тел. 8-495-362-44-95, e-mail: 49536244@vniipbt.info, <https://www.vniipbt.info>

Подпись суки	<i>Волкова</i>
ЗАВЕРЯЮ: ученый	<i>Сергеева</i>
секретарь	<i>Галина Сергеевна</i>
" 24 ноября 2025 г.	

