

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального государственного автономного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»),
доктор технических наук,
академик РАН


А. Г. Галстян
«19» ноября 2025 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного автономного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» на диссертационную работу **Нестеровой Екатерины Юрьевны** на тему: **«Комплексные исследования состава пробиотических продуктов и заквасок с применением высокопроизводительного секвенирования и целевых ПЦР методов»**, представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1. Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ.

Актуальность темы диссертационной работы Нестеровой Екатерины Юрьевны связана с несовершенством традиционных культуральных методов, которые не обеспечивают достоверной идентификации и количественной оценки состава пробиотиков и производственных заквасок. Фактический состав таких культур нередко отличается от заявленного, что требует применения более точных молекулярно-генетических подходов для контроля таксономического состава.

Однако одной лишь идентификации микробного состава недостаточно, поскольку в процессе ферментации микробные сообщества претерпевают существенные изменения, определяющие функциональные и органолептические свойства конечного продукта. Поэтому изучение

динамики микроорганизмов в ходе ферментации является естественным и необходимым продолжением задачи контроля микробного состава. Особенно это важно при создании новых заквасочных культур, поскольку поведение отдельного штамма в монокультуре и в составе консорциума оказывается принципиально различным вследствие конкуренции за субстрат, перекрёстного питания, метаболической кооперации, а также изменений pH и других параметров среды.

Следует отметить, что в российской научной литературе отсутствует достаточное количество работ, в которых бы комплексно анализировались как исходный состав пробиотических и заквасочных культур, так и динамические изменения их структуры в процессе ферментации. Дефицит подобных исследований затрудняет разработку стандартизованных подходов к формированию производственных консорциумов и повышению стабильности технологического процесса. Представленная диссертационная работа восполняет существующий пробел, обеспечивая экспериментально подтверждённые данные, имеющие прикладное значение для промышленного производства пробиотиков и ферментированных продуктов.

Научная новизна диссертационного исследования определена следующими позициями:

- Установлены оптимальные методы выделения бактериальной ДНК и концентрирования ампликонов, повышающие эффективность последующего секвенирования.
- Подтверждена целесообразность применения высокопроизводительного секвенирования наряду с классическими микробиологическими методами, что позволило определить полный бактериальный состав исследуемых пробиотических и заквасочных микробных сообществ.
- В ходе анализа динамики бактериального сообщества в процессе ферментации выявлено выраженное снижение относительной численности бифидобактерий на фоне доминирования лактобацилл, что указывает на наличие конкурентных и антагонистических взаимодействий в составе

исследованных многокомпонентных заквасок. Полученные данные следует учитывать при формировании производственных консорциумов и выборе условий ферментации, а также при разработке технологий обогащения пробиотических продуктов бифидобактериями. С учётом чувствительности бифидобактерий к условиям ферментации и их подавления более активными лактобациллами, в ряде технологических схем целесообразно рассматривать их внесение на поздних этапах производства для обеспечения требуемой жизнеспособности клеток.

– Разработаны методы ПЦР-ПДРФ для идентификации видов, принадлежащих к родам *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, значимых для промышленного применения. Показано, что набор конкретных рестриктаз позволяет надёжно дифференцировать виды *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* и *B. animalis*.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Нестеровой Е. Ю. заключается в обосновании и экспериментальном подтверждении эффективности применения высокопроизводительных методов анализа для определения бактериального состава пробиотических и заквасочных культур, а также в разработке и верификации ПЦР-ПДРФ-подходов для видовой идентификации производственно значимых культур.

Практическая значимость диссертационной работы подтверждается следующими аспектами:

- Разработаны и экспериментально верифицированы ПЦР-ПДРФ-подходы, обеспечивающие надёжную видовую идентификацию технологически значимых представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, включая близкородственные виды, трудные для дифференциации классическими культуральными методами.
- Оптимизирован протокол выделения бактериальной ДНК, включающий использование диоксида кремния и гуанидинтиоцианата, что обеспечивает

высокое качество и выход нуклеиновых кислот для последующего секвенирования.

— Показана применимость высокопроизводительного секвенирования для объективной оценки полного бактериального состава пробиотических и заквасочных культур и анализа его динамики в процессе ферментации, что делает возможным более точный контроль качества и стабильности производственных заквасок.

— Установлены закономерности изменения микробного состава в ходе ферментации, включая снижение доли бифидобактерий под воздействием более активных лактобацилл, что позволяет учитывать межвидовые взаимодействия при формировании производственных консорциумов и корректировке технологических режимов.

Оценка содержания работы, её завершенность. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, практических предложений, списка сокращений, списка использованных источников из 237 наименований и приложения. Объем диссертации составляет 128 страниц машинописного текста, содержит 10 таблиц и 22 рисунка.

Во введении изложены актуальность проводимых исследований, научная новизна, практическая и теоретическая значимость, определены цели и задачи исследования. Представлены положения, выносимые на защиту, и информация о работах, опубликованных по результатам исследования.

В первой главе проанализирована и обобщена информация о заквасках и пробиотиках, применении их в пищевой промышленности, а также молекулярно-генетических методах контроля их качества и состава.

Во второй главе перечислены объекты и методы исследования, применяемые в рамках выполнения диссертационной работы.

В третьей главе представлены результаты исследования и их обсуждение. Описаны эксперименты по оптимизации метода выделения ДНК и концентрирования продуктов ПЦР, исследованию таксономического состава коммерческих заквасок и пробиотиков, изучению динамики бактериального

состава молочной основы в процессе ферментации, анализу технологических свойств пробиотических заквасок, а также по видовой идентификации лактобактерий и бифидобактерий на основе ПЦР-ПДРФ.

В заключении и выводах представлены основные результаты и аспекты проделанной работы, соответствующие поставленным целям и задачам.

Степень достоверности результатов исследований подтверждается использованием поверенного лабораторного оборудования, применением аттестованных и апробированных методик выделения ДНК, ПЦР-анализа, ПЦР-ПДРФ и высокопроизводительного секвенирования, а также корректной обработкой данных с использованием современных биоинформатических подходов. Все эксперименты выполнены в соответствии с требованиями воспроизводимости и внутреннего контроля качества.

Достоверность результатов подтверждается публикациями по теме диссертации в ведущих рецензируемых научных изданиях, включая журналы, рекомендованные ВАК РФ, а также представлением материалов на научных конференциях. По теме диссертационной работы опубликовано 11 печатных работах, 3 из которых опубликованы в рецензируемых и реферируемых журналах из перечня Scopus и/или Web of Science, 3 опубликованы в изданиях, входящих в базу данных RSCI, имеется 1 патент на изобретение. Выносимые на защиту научные положения характеризуются достоверностью, подтвержденной экспертами-рецензентами данных изданий. Основные положения изложены на Всероссийских и Международных конференциях различного уровня.

Диссертационная работа выполнена в рамках гранта РФФИ №24-24-20036 и государственного задания (проект FZGW-2024-0003).

Диссертационная работа выполнена на современном методическом уровне; объем экспериментальных данных является достаточным для обоснования выводов. Применённые методы соответствуют актуальным требованиям к исследованиям в области микробиологии, биотехнологии и

технологий пищевых продуктов, что позволяет уверенно говорить о высокой степени достоверности полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа Нестеровой Е. Ю. полностью соответствует паспорту научной специальности 2.7.1. Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ (технические науки) в части пунктов:

9. Производство и использование стартовых культур, бактериальных заквасок, биопрепаратов.

18. Разработка новых методов исследования сырья, пищевых и лекарственных добавок и препаратов, готовых продуктов питания.

Общая оценка, вопросы и замечания

В качестве общей оценки диссертации следует отметить, что работа Нестеровой Екатерины Юрьевны представляет собой цельное и завершённое научное исследование, выполненное на современном методическом уровне и включающее значительный объём экспериментальных данных, подтверждающих достоверность полученных результатов и их практическую востребованность в области биотехнологии пищевых продуктов. Диссертационная работа включает введение, три главы, выводы, список литературы из 237 источников, а также 1 приложения. Основной текст диссертации изложен на 100 стр. последовательно и логично, хорошо структурирован и сопровождается 10 информативными таблицами и 22 рисунками, что способствует наглядности и облегчает восприятие материала. Обзор литературы охватывает актуальные отечественные и зарубежные источники по тематике исследования и демонстрирует глубокое понимание автором современного состояния вопроса.

Экспериментальная часть выполнена с использованием современных аналитических методов, включая высокопроизводительное секвенирование, ПЦР-ПДРФ и валидированные процедуры выделения ДНК. Полученные данные являются репрезентативными, обработаны корректно, представлены в

достаточном объёме и обоснованно интерпретированы. Выводы диссертационной работы логично вытекают из представленных результатов, полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования и подтверждают научную добросовестность автора.

Автореферат диссертации в полной мере отражает содержание работы, корректно передаёт её основные результаты и оформлен в соответствии с действующими требованиями ВАК РФ.

При ознакомлении с диссертационной работой возник ряд дискуссионных вопросов и замечаний:

1. В литературном обзоре (п. 1.3, стр. 20) и в разделе 3.3 (стр. 59) автор подчёркивает важность контроля эукариотических микроорганизмов, включая дрожжи, а также необходимость строгого регламентирования состава заквасок и пробиотиков. Однако в экспериментальной части исследование ограничено бактериальной составляющей, и анализ возможного присутствия дрожжевых и других эукариотических микроорганизмов не проводился. Несмотря на отсутствие заявленных эукариотических культур в составе используемых коммерческих заквасок, фактический микробный состав таких культур нередко отличается от указанного производителем. С учётом того, что требования к регламентированию состава предполагают оценку всех потенциальных компонентов микробного сообщества, включение анализа эукариотического компонента позволило бы получить более полное и объективное представление о составе исследуемых образцов.

2. Использованное в работе секвенирование участка V4 гена 16S рРНК обладает ограниченным таксономическим разрешением и позволяет идентифицировать микроорганизмы преимущественно на уровне рода. При этом выбор данного участка в диссертации не обоснован, хотя для пробиотических и заквасочных культур, содержащих близкородственные виды, критически важна именно видовая и штаммовая идентификация. Применение более информативных участков 16S или методов полногеномного секвенирования обеспечило бы значительно более точную

таксономическую детализацию и повысило бы информативность исследования.

3. При интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования в диссертации не учитывается вариабельность числа копий гена 16S рРНК у разных бактерий. Известно, что количество копий 16S рРНК в бактериальном геноме может варьировать от одной до пятнадцати и более, что приводит к систематическому смещению относительных пропорций таксонов в ампликонных профилях и ограничивает корректность количественной оценки микробных сообществ. Указание данного ограничения или использование методов, позволяющих нормализовать эффекты разного числа копий, повысило бы точность представленной таксономической оценки.

4. В работе не указано число биологических повторов и технических реплик при проведении ферментации, ПЦР и высокопроизводительного секвенирования. Отсутствие информации о повторности экспериментов затрудняет оценку воспроизводимости полученных результатов и статистической надёжности выявленных закономерностей.

Вместе с тем, указанные замечания и вопросы не снижают общего положительного впечатления от диссертации, подготовленной на высоком научном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Нестеровой Екатерины Юрьевны на тему «Комплексные исследования состава пробиотических продуктов и заквасок с применением высокопроизводительного секвенирования и целевых ПЦР методов», выполненная под научным руководством кандидата биологических наук, доцентом М. Ю. Сыромятникова, является научно-квалификационной работой, в которой на основании проведённых исследований решена актуальная задача идентификации таксономического состава пробиотических культур и исследуемых заквасок с использованием современных молекулярно-генетических подходов, включая разработанный автором метод

ПЦР-ПДРФ для видовой дифференциации технологически значимых бактерий.

В диссертации представлено комплексное исследование, включающее оптимизацию метода выделения ДНК, разработку подхода к концентрированию ампликонов 16S рРНК, создание и верификацию метода ПЦР-ПДРФ для идентификации видов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также применение высокопроизводительного секвенирования для анализа состава и динамики микробных консорциумов в процессе ферментации. Работа выполнена на высоком теоретическом и практическом уровне, демонстрирует глубокое понимание предметной области, грамотную постановку экспериментов, логичность изложения и обоснованность полученных результатов.

Представленные данные отличаются высокой степенью достоверности и подтверждаются значительным объёмом экспериментального материала, а разработанный метод ПЦР-ПДРФ и результаты NGS-анализа обладают выраженной прикладной значимостью для контроля состава пробиотических культур, стандартизации заквасок и оптимизации технологических параметров производства ферментированных продуктов.

По актуальности, новизне, практической значимости диссертация на тему «Комплексные исследования состава пробиотических продуктов и заквасок с применением высокопроизводительного секвенирования и целевых ПЦР методов» полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. от 16.10.2024), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата технических наук, а её автор, Нестерова Екатерина Юрьевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата технических наук по специальности 2.7.1. Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ.

Отзыв на диссертационную работу Нестеровой Екатерины Юрьевны «Комплексные исследования состава пробиотических продуктов и заквасок с применением высокопроизводительного секвенирования и целевых ПЦР методов» рассмотрен и утвержден на расширенном заседании лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов. Присутствовало на заседании 15 человек. Результаты голосования: «за» – 15 человек, «против» – 0 человек, «воздержалось» – 0 человек (протокол № 4 от 19 ноября 2025 г.).

Отзыв подготовлен:

Заведующий лабораторией
прикладной микробиологии
и геномики микроорганизмов
ФГАНУ «ВНИМИ»,
кандидат биологических наук

 Фоменко Олег Юрьевич

Контактные данные:

Федеральное государственное автономное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт молочной
промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)
115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп. 7.
Тел.: +7 (499) 236-31-64
Электронная почта: info@vnimi.org

Подпись руки Фоменко О.Ю. удостоверяю:

Начальник отдела кадров ФГАНУ «ВНИМИ»



Маркина М.А.