

## ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Н.Г. Лойко на диссертационную работу Хохлачевой Александры Алексеевны «Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

В настоящее время, когда наблюдается снижение защитных сил организма человека, связанное с нарушениями бактериального баланса в желудочно-кишечном тракте, отмечается устойчивая тенденция к повышению потребительского спроса на кисломолочные пробиотические продукты высокого качества на основе натурального сырья. Поэтому актуальность исследования Хохлачевой А.А., связанного с изучением ассоциативной культуры микроорганизмов кефирных грибков для определения их биотехнологического потенциала в технологиях получения кисломолочного пробиотического продукта, богатого биологически активными веществами и экзополисахаридом кефираном, не вызывает сомнений. Интерес исследователей к разработке продуктов с жизнеспособными клетками молочнокислых бактерий, которые выполняют защитную и детоксицирующую функции, обусловлен их важностью в поддержании здоровья человека. Эти бактерии являются симбионтами человека, обитая в его кишечнике, на слизистых оболочках, на коже. Молочнокислые бактерии выполняют ряд важных для человека функций – препятствуют развитию патогенных микроорганизмов (за счёт выделения бактериоцинов), поддерживают низкий рН (выделяя молочную, уксусную и другие органические кислоты), выделяют компоненты (метаболиты разной природы и ферменты), укрепляющие кожные покровы и слизистые человека (влияя на биосинтетическую и пролиферативную активность клеток), укрепляют иммунитет.

В этой связи кисломолочные продукты, полученные при культивировании кефирных зерен, являются идеальным сбалансированным продуктом, так как кроме большого спектра биологически активных веществ, имеют в своем составе различные группы микроорганизмов. И хотя изучение кефирных грибков ведется уже в течение длительного времени, до сих пор остаются без ответа много вопросов, касающихся микробного состава, трофических взаимоотношений компонентов и биотехнологического потенциала сообществ кефирных грибков. На эти и ряд других вопросов дает ответы исследование Хохлачевой А.А., отраженное в рецензируемой диссертационной работе, научная и практическая актуальность которого не вызывает сомнений.

Научная новизна представленных диссертационных исследований заключается в том, что, систематизировав большое количество литературных данных и проведя собственное всестороннее исследование, Хохлачева А.А. представила концептуальную модель микробного сообщества кефирных грибков, включающую микробный профиль и трофические взаимоотношения между микробными компонентами сообщества. Диссертантом была показана и обоснована важная роль фермента  $\beta$ -галактозидазы в регуляции стабильности микробного сообщества, а также выявлены две физиологические группы молочнокислых бактерий кефирных грибков, отличающиеся способностью к синтезу данного фермента. Впервые была подробно проанализирована способность ряда молочнокислых бактерий синтезировать экзополисахариды, типа кефирана.

Основной практической значимостью диссертационного исследования Хохлачевой А.А. является разработка модели микробного сообщества кефирных грибков, позволяющая не только объяснять полученные закономерности, но и разрабатывать алгоритмы управления ассоциативной культурой. Результатом этих исследований стало создание пробиотического продукта для диетического питания на безлактозном молоке, а также

разработка технологии получения экзополисахаридов (оформлена заявка на патент).

Диссертационная работа Хохлачевой А.А. изложена на 167 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, экспериментальной части и обсуждения результатов, выводов, заключения, списка использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 27 таблицам и 25 рисунками. Кроме того, дополнительные разъясняющие таблицы и ИК-спектры автор вынесла в раздел приложение.

Литературный обзор выполнен на основании 210 источников, 127 из которых на иностранном языке, состоит из 3 глав. В первой главе подробно описаны закономерности функционирования микробных сообществ, как природных, так и спонтанных. Проанализированы вопросы формирования микробного профиля различных консорциумов, метаболические взаимодействия между членами, в том числе трофические взаимоотношения, а также возможные пути саморегуляции и адаптации микробных сообществ. Во второй главе автор остановился на подробном рассмотрении закономерностей функционирования микробного сообщества кефирных грибков, что имеет непосредственное отношение к теме диссертации. Последняя, третья глава литературного обзора посвящена описанию полисахаридов микроорганизмов и в частности, экзополисахарида кефирных грибков кефирана. Для структурирования материала литературного обзора автор воспользовался таблицами, что значительно упростило восприятие информации.

Методическая часть работы отличается продуманностью набора современных микробиологических, биохимических, биофизических и молекулярно-генетических методов. Привлечение для исследования микробного состава кефирных грибков наряду со стандартными молекулярно-генетическими определениями метода градиентного гель электрофореза позволило показать идентичность состава доминирующих

форм молочнокислых бактерий кефирных зерен, используемых на разных молочных предприятиях.

Также хорошо методически обоснованы эксперименты по определению структуры, количественного состава и термодинамических параметров экзополисахаридов, выделенных при культивировании кефирных грибков. Это обеспечило получение приоритетных данных о способностях разных видов молочнокислых бактерий синтезировать водорастворимые экзополисахариды, типа кефирана.

Результаты экспериментальных исследований изложены в 4 главах. Первые две посвящены изучению микробного профиля и функциональной активности кефирных грибков, культивируемых на нативном и безлактозном молоке. В работе диссертант исследовала широкий круг объектов – кефирных грибков, применяемых на молочных предприятиях городов Ставрополя, Гагарина, Москвы и Владикавказа. Комплексный подход и использование различных методов, включая электронно-микроскопические и молекулярно-генетические исследования, позволили автору сделать заключение о сходстве микробного состава кефирных грибков различного происхождения и заквасок, полученных на их основе. Следует отметить большую экспериментальную работу, проведенную диссертантом в данной части исследования, по выделению и исследованию более чем 160 изолятов, полученных при культивировании на нативном и безлактозном молоке. Важный практический вывод, полученный диссертантом в данной части работы, заключается в показанной возможности использования кефирных грибков для получения пробиотических продуктов на субстратах, не содержащих лактозу.

В третьей главе диссертации автор на основании изучения физиологической активности выделенных из кефирных зерен изолятов микроорганизмов предлагает схему трофической цепи ассоциативной культуры кефирных грибков, что может безусловно являться основой для создания искусственных высокопроизводительных ассоциаций

молочнокислых микроорганизмов, для получения кисломолочных продуктов с различными свойствами.

В заключительной 4-ой главе диссертации автор проводит скрининг выделенных из кефирных грибков изолятов для определения наиболее способных к синтезу экзополисахаридов, а затем исследует возможность увеличения их продуктивности путем варьирования условий культивирования. В результате исследования были отобраны наиболее активные (до 4.8 г/л) продуценты полисахаридов (*Lactococcus lactis* и *Leuconostoc mesenteroides*) и изучены их ростовые и физиологические характеристики при культивировании в разных условиях как в периодическом режиме, так и непрерывном. Самый продуктивный по синтезу экзополисахаридов штамм *Leuconostoc mesenteroides* 8 (B-11942) был депонирован в ВКПМ ФГУП ГосНИИгенетики. Для исследования структуры экзополисахаридов, выделенных из кефирных грибков и полученных при культивировании чистых культур молочнокислых бактерий, автор успешно воспользовалась методом ИК-спектроскопии, доказав их структурное сходство. Затем, воспользовавшись методом динамического и статистического светорассеивания, выявила отличия в исследуемых экзополисахаридах разных продуцентов, что подтверждало их разную функциональную активность.

Замечания. Явных недостатков работа не имеет, за исключением небольших замечаний:

1. При изучении микробного профиля кефирных грибков с помощью стандартных микробиологических методов, автором были сделаны важные наблюдения о том, что часто один и тот же вид молочнокислых бактерий давал морфологически разные типы колоний на плотных средах. Это явление широко известно, как колониально-морфологическая изменчивость или диссоциативная активность микроорганизмов, и имеет большое значение в

биотехнологической практике. Однако, наблюдаемое явление осталось без должного обсуждения диссертанта.

2. Используя в своей работе метод DGGI, и получая микробный профиль образцов кефирных грибков, автор говорит только о выявлении четко выраженных полос в геле, соответствующих различным видам микроорганизмов и полученном этим методом сходстве микробных профилей изучаемых объектов. Однако дальнейшая идентификация молочнокислых микроорганизмов проведена не была. Хотелось бы порекомендовать довести эти исследования до конца, чтобы можно было четко сравнить микробные профили кефирных грибков, полученных различными методами.

3. В главе 3.1.2 (стр. 87) упоминается исследование ДНК дрожжей, выделенных из накопительных культур, на содержание ГЦ пар. Однако, методика проведения эксперимента не описана в разделе «Материалы и методы».

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают значимость полученных результатов.

Диссертация написана хорошим научным языком, аккуратно оформлена, с минимальным количеством опечаток. Автореферат диссертации полностью отражает её основное содержание. Актуальность, новизна и практическая значимость диссертационной работы объективно изложены в полном соответствии с полученными результатами и современными представлениями в этой области. Выводы хорошо сформулированы и адекватным поставленным задачам. Следует подчеркнуть практическую ценность выполненной А.А. Хохлачевой работы, включающей разработку технологий получения молочнокислого безлактозного пробиотического продукта и экзополисахарида кефирана. Последняя нашла отражение в заявке на патент РФ.

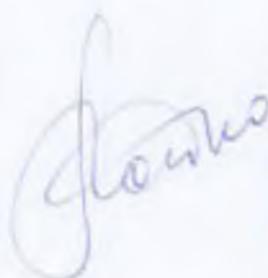
Полученные диссертантом результаты были представлены на российских конференциях. По материалам диссертации опубликовано 5

экспериментальных статей в журналах, рекомендованных ВАК, 6 тезисов конференций, 1 заявка на патент РФ.

Таким образом, общий объем исследований, проведенных А.А. Хохлачевой на высоком методическом уровне, их актуальность, новизна и значимость для биотехнологической практики заслуживают высокой оценки. Диссертация Хохлачевой Александры Алексеевны соответствует п.п. 3 и 8 "Паспорта специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнология), а также критериям п.9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства России № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов  
Института микробиологии имени С.Н. Виноградского,  
Федерального государственного учреждения «Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные  
основы биотехнологии» Российской академии наук»  
119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом № 33 стр. 2.  
Тел. (495)954-5283, ФАКС – (495)954-2732  
e-mail: loikonat@mail.ru

кандидат биологических наук  
(03.00.23 – биотехнология)  
18.11.2015 г.

 Наталья Геннадиевна Лойко  
  


## СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертационной работе Хохлачевой Александры Алексеевны «Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень	Шифр специальности	Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет
Лойко Наталья Геннадиевна	Российская Федерация	Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», научный сотрудник	Кандидат биологических наук	03.00.23 - биотехнология	<p>1. Кряжевских Н.А., <b>Лойко Н.Г.</b>, Демкина Е.В., Мулюкин А.Л., Лебедев А.Т., Гапонов А.М, Тутельян А.В., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И. Оценка применимости масс-спектрометрического метода МАЛДИ для диагностики внутривидовых диссоциантов бактерий // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 291-310.</p> <p>2. <b>Лойко Н.Г.</b>, Краснова М.А., Пичугина Т.В., Гриневич А.И., Ганина В.И., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Изменение диссоциативного спектра популяций молочнокислых бактерий при воздействии антибиотиков // Микробиология. 2014. Т. 83. №3 С.284-294.</p> <p>3. Антонова С.П., Кареткин Б.А., <b>Лойко Н.Г.</b>, Шакир И.В., Панфилов В.И. Повышение стабильности молочнокислых бактерий при глубинном гетерофазном культивировании // Успехи в химии и химической технологии. 2014. Т.28. № 4 (153). С. 125-128.</p> <p>4. <b>Лойко Н.Г.</b>, Кареткин Б.А., Симон Н.А., Шаненко Е.Ф., Пичугина Т.В., Гриневич А.И., Ганина В.И. Пробиотические продукты. Новые приемы повышения качества // Молочная промышленность. 2013. № 10. С. 57-59.</p> <p>5. Кареткин Б.А., <b>Лойко Н.Г.</b>, Шакир И.В., Панфилов В.И. Глубинное гетерофазное культивирование молочнокислых бактерий // Биотехнология. 2013. Т. № 1.</p>

				<p>С. 59-68.</p> <p>6. <b>Лойко Н.Г.</b>, Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Козлова А.Н., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Действие реактивирующего фактора <i>Luteococcus japonicus subsp. casei</i> на экспрессию генов SOS-ответа // Микробиология. 2013. Т. 82. № 2. С. 126-132.</p> <p>7. Мартиросова Е.И., Плащина И.Г., <b>Лойко Н.Г.</b>, Краснова М.А., Эль-Регистан Г.И. Регулирование функциональных свойств лизоцима путем взаимодействия с 5-метилрезорцином // Химическая физика. 2014. Т. 33. № 8. С. 43.</p> <p>8. Крупянский Ю.Ф., Абдулнасыров Э.Г., <b>Лойко Н.Г.</b>, Степанов А.С., Терешкина К.Б., Эль-Регистан Г.И. Возможные механизмы влияния гексилрезорцина на структурно-динамические и функциональные свойства белка лизоцима // Химическая физика. 2012. Т. 31. № 3. С. 60.</p> <p>9. Голод Н.А., <b>Лойко Н.Г.</b>, Мулюкин А.Л., Нейматов А.Л., Воробьева Л.И., Сузина Н.Е., Шаненко Е.Ф., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям // Микробиология. 2009. Т. 78. № 3. С. 317-335.</p>
--	--	--	--	---

Научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов  
 Института микробиологии имени С.Н. Виноградского  
 Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»  
 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом № 33 стр. 2. Тел. (495)954-5283, ФАКС – (495)954-2732  
 e-mail: loikonat@mail.ru

кандидат биологических наук (03.00.23 – биотехнология)

18.11.2015 г.

*Лойко*



Наталья Геннадиевна Лойко



## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Л.Г.Стойановой на диссертационную работу **Хохлачевой Александры Алексеевны** «Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

В последние годы организм человека подвергается воздействию целого комплекса неблагоприятных факторов, влияющих на нормальное функционирование основных систем жизнедеятельности: ухудшающаяся экологическая обстановка, увеличение количества стрессовых ситуаций, неправильное питание, а также бесконтрольное применение химиотерапевтических препаратов. Противостоять изменениям микробного состава организма под воздействием экологических, лекарственных, хирургических и других стрессовых агентов можно, обогатив микробиоту желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) полезными микроорганизмами, вносимыми извне. Это открытие дало импульс развитию целого направления в микробиологии: учению о пробиотиках – живых микроорганизмах, которые, попадая в организм при приеме пищи в определенных количествах, оказывают благотворный эффект на здоровье человека. Международный конгресс по пробиотикам, состоявшийся в США в 2001 г., по общему согласию констатировал перспективность применения пробиотиков и предложил считать XXI век «Эрой пробиотиков». В международной научной печати за три года (2009–2011 гг.) опубликовано свыше 2500 сообщений по проблеме пробиотиков. Одним из главных аспектов этого интереса является возросший спрос потребителей к качеству продуктов питания и их безопасности для здоровья.

Кефирный, он же молочный или тибетский, грибок существует и активно используется для получения полезного кефира уже много веков. Кефирный грибок – не что иное, как симбиотическая группа микроорганизмов, среди которых есть лактобактерии, уксуснокислые бактерии, молочные дрожжи и др. Тибетские монахи, которые обнаружили и научились культивировать кефирный грибок, заметили, что люди, постоянно употребляющие такой кефир, находились в прекрасной физической форме и испытывали меньше проблем со здоровьем. Сегодня многие врачи рекомендуют принимать кефир людям, страдающим онкологическими заболеваниями, а также вынужденным длительное время принимать антибиотики. Доминирующей, наиболее устойчивой и метаболически активной формой существования микроорганизмов в кефире является эволюционно сложившееся структурно оформленное микробное сообщество – кефирные грибки (кефирные зерна). Исследование закономерностей формирования состава и функционирования ассоциативных культур является приоритетным направлением

исследований биологов и биотехнологов при решении проблем управления такими сообществами. Однако данные, касающиеся микробиоты кефирных грибков и взаимоотношений микробов в сообществе, остаются противоречивыми. Исследование свойств микроорганизмов этого уникального симбиоза, разработка его концептуальной модели позволяют расширить общие представления о возможной структуре ассоциаций микроорганизмов, являются необходимыми для создания новых экспериментальных сообществ и разработки способов управления стабильностью кефирных грибков, определения их биотехнологического потенциала при создании пробиотического продукта, богатого биологически активными веществами, включая и синтезируемые ими экзополисахариды. В этой связи актуальность диссертационной работы Хохлачевой Александры Алексеевны «Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов» является очевидной.

Диссертация состоит из введения, 3 глав (литературный обзор, объекты и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение), выводов, заключения, списка литературы и 4х приложений; имеется перечень сокращений и условных обозначений. Общий объем диссертации 167 страниц (основная часть – 147 стр., приложения – 20 стр.), включает 27 таблиц и 25 рисунков. Библиографический список цитируемой литературы содержит 210 источников, из которых 126 на иностранном языке, и включают как классические работы отечественных и зарубежных исследователей, так и научные статьи последних лет.

Во «Введении» изложена актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследований, научная новизна, научная и практическая значимость работы.

Литературный обзор состоит из 3 глав. В первой главе подробно описаны закономерности функционирования микробных сообществ как природных, так и спонтанных, проведен анализ формирования микробного профиля различных консорциумов, метаболические взаимодействия между микробами в сообществе, в том числе трофические взаимоотношения, а также возможные пути саморегуляции и адаптации микробных сообществ.

Вторая часть обзора литературы посвящена общей характеристике кефирных грибков (морфологические свойства, химический состав, скорость роста). Показано разнообразие молочнокислых бактерий в разных кефирных грибах, при этом разные авторы выявили различные культуры при использовании как классических микробиологических методов, основанных на выделении чистых культур, так и метода без выделения чистых культур (метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза).

Описаны основные механизмы взаимодействий микробных компонентов кефирных грибков.

В третьей части описаны полисахариды микроорганизмов, рассмотрены закономерности синтеза экзополисахарида кефирных грибков кефирана, его биологические свойства, а также описаны отобранные культуры молочнокислых бактерий как продуцентов кефирана.

Изложение материала в литературном обзоре свидетельствует о глубоких познаниях диссертанта по изучаемой проблеме и умении работать с литературой. Литературные данные сведены в 5 таблиц, что облегчает восприятие информации. Обзор написан грамотным литературным языком с использованием научной терминологии и помогает правильно интерпретировать полученные результаты.

В главе 2 диссертации представлены объекты и методы исследования.

Основными объектами исследований служили кефирные грибки, применяемые при производстве кефира на разных молочных предприятиях, а также культуры бактерий, выделенные в процессе работы из кефирных зерен (закваска). В работе использованы классические микробиологические методы выделения чистых культур на твердых питательных средах, а также современные молекулярно-генетические методы с использованием метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) «без выделения чистых культур», что позволило наиболее объективно оценить микробный профиль кефирных грибков. Для анализа экзополисахаридов были использованы методы электронной микроскопии, физико-химические методы, динамического и статистического светорассеивания, метод ИК-спектроскопии.

Глава 3 «Результаты исследования и их обсуждение» состоит из трех больших частей, которые в свою очередь состоят из нескольких небольших подразделов. В первом подразделе представлены результаты изучения морфофизиологических свойств исследуемых кефирных грибков, используемых на разных молочных предприятиях. Показаны различия кефирных грибков по размеру, упругости, что учитывалось соискателем далее при выделении микробных компонентов сообщества кефирных грибков. Представлены результаты исследования микробного профиля кефирных грибков и их заквасок, при этом исследовано более 80 изолятов. Автором дается анализ трудности при использовании классических микробиологических методов высева на твердые питательные среды, что подтверждается результатами при использовании 16S рПНК анализа. Методом Life/Dead («живые/мертвые») было отмечено, что наряду с живыми клетками в кефирном зерне присутствуют некультивируемые клетки. Впервые доказано, что при сравнительной оценке микробного профиля кефирных грибков, используемых на разных молочных

производствах, не выявлено различий среди доминирующих форм молочнокислых бактерий в профиле кефирных грибков и культуральных жидкостях (заквасок) при их культивировании на молоке.

Во втором подразделе представлены данные исследования физиологической активности выделенных изолятов из кефирных грибков для определения трофических взаимодействий между микробными компонентами. В результате автором исследовалось около 33 изолятов бактерий и 55 изолятов дрожжей, показаны тесные симбиотические отношения молочнокислых бактерий и дрожжей.

Выявлено присутствие двух физиологически групп молочнокислых бактерий по их способности синтезировать фермент  $\beta$ -галактозидазу. Показана важная роль индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы в обеспечении стабильности микробного сообщества при изменении углеводного питания.

Полученные результаты дают автору возможность построения концептуальной модели ассоциативной культуры кефирных грибков, которая отражает присутствие двух физиологических групп молочнокислых бактерий, дрожжей и уксуснокислых бактерий.

Часть работы посвящена определению функциональной активности кефирных грибков, длительное время культивируемых на безлактозном молоке, что является оригинальным экспериментом. Соискателем были исследованы способность образования сгустка, снижение рН среды, титруемой кислотности культурами кефирных грибков на протяжении более 4-х лет культивирования, что позволило автору сделать объективный вывод о том, что при длительном культивировании на безлактозном молоке не изменилась функциональная активность кефирных грибков, не выявлено различий в микробном профиле кефирных грибков по сравнению с культивированием в обычном молоке. Результаты этого эксперимента дают предпосылку для разработки пробиотического продукта, перспективного для диетического питания людей с людей с лактазной недостаточностью.

Поскольку было показано отсутствие различий в структуре полисахаридов кефирных грибков, длительное время культивируемых в безлактозном и нативном молоке, то дальнейшие исследования (часть 4) были направлены на изучение кефирных грибков как продуцентов экзополисахаридов. На основании скрининга полисахаридсинтезирующих молочнокислых бактерий автором показано, что из 119 исследованных изолятов 60% способны синтезировать экзополисахариды. Из них отобраны 9 изолятов, наиболее активно синтезирующих экзополисахариды. К новым результатам можно отнести данные о способности разных видов молочнокислых бактерий синтезировать экзополисахариды, по своей структуре аналогичные экзополисахариду кефирану, но отличающегося

молекулярной массой. Отмечено повышение активности синтеза экзополисахаридов на среде с сахарозой молочнокислыми бактериями, способными сбраживать сахарозу. Отобраны культуры *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* как наиболее активные продуценты экзополисахаридов при культивировании их на среде с лактозой и сахарозой. При сравнительном исследовании экзополисахаридов из кефирных грибков и синтезированных этими культурами методами ИК-спектроскопии и методом динамического и статистического светорассеивания соискателем показана аналогичность их структуры, но обнаружены различия физико-химических свойств

Практическое значение имеют разработанные режимы периодического и непрерывного культивирования отобранного штамма *L. mesenteroides*, и обеспечивающие уровень накопления ЭПС в среде до 3.5 г/л, что является на уровне достигаемых концентраций экзополисахаридов, описанных в литературе. Разработана технологии получения экзополисахаридов (оформлена заявка на патент).

По диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. В диссертационной работе по тексту автор использует 2 термина, определяющих совокупность различных видов микроорганизмов, населяющих определенную область, «микробиота» и «микрофлора». В этом значении ранее в научной литературе использовался термин «микрофлора», что не совсем корректно, поскольку в настоящее время бактерии не относят к царству растений (флоре). Сейчас правильнее употреблять термин «микробиота».
2. В литературном обзоре имеются неточности. Название таблицы 1.1 «Микробный бактериальный состав кефирных грибков» не логично: бактерии входят в состав микробов. Правильно: «Микробный состав кефирных грибков», и там же в группе бактерий сообщества кефирных грибков включены базидиомицеты *Cryptococcus humicolus*, которые не являются бактериями.
3. В работе по тексту изложения использованы сокращения, которые не являются общепринятыми и не приведены в списке сокращений. Культуры *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* относятся к разным, группам молочнокислых бактерий и нельзя сокращать их родовое название одинаково- *L. lactis* и *L. mesenteroides*. *L. plantarum* в одной строке, если нет рядом определяющего слова (лактококки, леуконосток, лактобациллы).
4. Подписи в названиях рисунков и таблиц не должны содержать сокращений. В некоторых таблицах и рисунках не приведен доверительный интервал измерений, что затрудняет анализ данных. В «материалах и методах» нет ссылки на метод статистической обработки данных экспериментов.

5. В работе и автореферате имеются опечатки.

Следует отметить, что сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают значимость полученных результатов.

Автореферат составлен в классической форме и отражает содержание, основные результаты исследований, изложенные в диссертации. Исследования проведены на высоком методическом уровне с применением методов, адекватных поставленным задачам.

Результаты исследований наглядно иллюстрированы таблицами и рисунками, подтверждающими глубокий анализ экспериментальных данных. Сформулированные автором выводы соответствуют поставленным задачам, полностью обоснованы результатами собственных исследований. Содержание работы соответствует специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

**По материалам диссертации** опубликовано 11 печатных работ (из них 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ) и подана 1 заявка на патент.

Результаты исследований достаточно полно отражены в научных публикациях, апробированы на конференциях разного уровня.

Все это позволяет считать, что диссертация Хохлачевой А.А. «Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) является самостоятельной завершённой научно-исследовательской работой, выполненной на актуальную тему, по научной новизне, методическому уровню и практической значимости полностью отвечает критериям «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, а её автор **Хохлачева Александра Алексеевна** достойна присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии  
биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова  
Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, 1 стр.12  
тел. (495) 939-45-45, E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Л.Г.Стоянова

Ученый секретарь  
биологического факультета  
МГУ имени М.В.Ломоносова

Е.В.Петрова

Декан биологического факультета  
МГУ имени М.В.Ломоносова  
академик



М.П.Кирпичников

23.11.2015<sub>2</sub>

## Сведения об официальном оппоненте:

**Стоянова Лидия Григорьевна** выпускница Биолого-почвенного факультета МГУ по специальности «биохимия растений», специализация «микробиология».

**Ученая степень** - доктор биологических наук

**Ученое звание** - старший научный сотрудник /доцент

**Работает** ведущим научным сотрудником кафедры микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Кандидат биологических наук с 1976 года. Диссертация «Ферментирование яичного белка микроорганизмами» выполнена на кафедре микробиологии и защищена в совете при биологическом факультете МГУ по специальности 03.00.07 - микробиология. В 2008 году защитила докторскую диссертацию «Новые бактериоцины лактококков и их практическое использование» по специальностям 03.00.07 - микробиология и 03.00.23 – биотехнология в диссертационном совете Д 501.001.21 при решении диссертационного совета от 17 июля 2008 г, № 2.

Она является высококвалифицированным специалистом и выполняет важную научную работу по созданию эффективных пробиотиков и биоконсервантов для пищевой и медицинской промышленности.

**Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет**

1. А.Б. Шевцов, А.Р. Кушугулова, С.С. Кожаметов, С.С. Оралбаева, Л.Г.Стоянова. Генотипирование *Lactobacillus casei* на основе анализа нуклеотидной последовательности генов *groEL*, *rpoB* и *rplB* // Ж. Экология и промышленность России. 2010. №5, С.38-41
2. Блинкова Л.П., Пахомов Ю.Д., Стоянова Л.Г. Свойства некультивируемых и покоящихся форм микроорганизмов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. №3. С.67-76
3. Блинкова Л.П., Ю.Д. Пахомов, Л.Г. Стоянова. Свойства некультивируемых и покоящихся форм микроорганизмов// Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 3. С. 67–76.
4. Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Sultimova T.D., Bilanenko E.N., Fedorova G.B., Katrukha G.S., Netrusov A.I. New antifungal bacteriocin-synthesizing strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as the perspective biopreservatives for protection of raw smoked sausages // Am. J. Agricult. Biol. Sci. 2010.V. 5. No4. P. 477-485.
5. Устюгова Е. А., Федорова Г. Б., Катруха Г. С., Стоянова Л. Г. Изучение антибиотического комплекса, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 вариант-К // Микробиология. 2011.Т. 80. №5. С. 644-650.
6. Пахомов Ю.Д., Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова. Роль некультивируемых форм неспорообразующих микроорганизмов в поддержании гомеостаза популяции // Иммунопатология, аллергология, инфектология . 2010 . № 4. С. 57–66.
7. Стоянова Л. Г., Устюгова Е. А., Нетрусов А. И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) // Прикл. Биохим. Микробиол. 2012.Т. 48. №3. С. 259-275.
8. Устюгова Е. А., Тимофеева А.В., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И., Катруха Г.С. Характеристика и идентификация бактериоцинов, образуемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К // Прикл. Биохим. Микробиол. 2012. Т. 48. №6. С. 618-625.
9. Моисеева Е.В., Устюгова Е.А., Семушина С.Г., Аронов Д.А., Стоянова Л.Г. 2012. Влияние культуры *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К на проявление симптомов спонтанного хронического дерматоза // Фундаментальные исследования. №6. С. 333-337.
10. Шевцов А.Б, А.Р.Кушугулова, И.К.Тыныбаева С.С.Кожаметов, А.Б. Абжалелов,

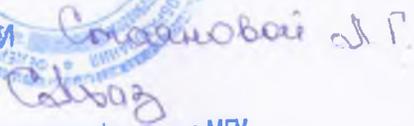
К.Т. Момыналиев, Л.Г. Стоянова ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОТИПИЧЕСКИ И ГЕНЕТИЧЕСКИ БЛИЗКИХ ВИДОВ *Lactobacillus* НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ *16S rRNA*, *groEL*, *rpoB* и *rplB*. // Микробиология. 2011, том 80, № 5, с. 659–668

11. А.Б. Шевцов, А.Р. Кушугулова, И.К. Тыныбаева, С.С. Кожаметов, А.Б. Абжалелов, К.Т. Момыналиев, Л.Г. Стоянова. Идентификация бактерий рода *Lactobacillus* на основе анализа фрагмента гена бета-субъединицы РНК-полимеразы *rpoB*. // Ж. Вестник Московского университета. Сер. Биология. 2011. 1. с. 26–31.
12. Пахомов Ю.Д., Л.П. Блинкова, О.В. Дмитриева, Л.Г. Стоянова. Длительный мониторинг жизнеспособности и образования некультивируемых форм *Lactococcus lactis*. // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. №. 3. С. 92–96
13. Yury D. Pakhomov, Larisa P. Blinkova, Olga V. Dmitrieva, Olga S. Berdyugina, Lidia G. Stoyanova "Nonculturability and nisin production of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*" J. Bacteriology and Parazitology. 2013, V.5. P.178-183
14. Ушакова Н.А., Павлов Д.Н., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.Н. патент-№ 2546880. «Способ получения кормового пробиотического препарата для сельскохозяйственных животных» (заявка № 2013125554/10(037647) от 03.06.2013) опуб. Бюллетень № 34 от 10.04.2015
15. Тренина М.А., Епремян Х.С., Стоянова Л.Г. Зависимость ростовых характеристик бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 729 от состава агаризованной питательной среды, используемой для наращивания биомассы. Вестник Московского университета. 2015. Серия 16. Биология, № 1, с. 39-44

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии  
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова  
Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, 1 стр.12  
тел. (495) 939-45-45, E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

 Л.Г. Стоянова

ПОДПИСЬ РУКИ  
ЗАВЕРЯЮ

  
  
Документовед биологического факультета МГУ