

**В диссертационный совет по защите
диссертаций на соискание ученой степени
кандидата наук,
на соискание ученой степени
доктора наук
24.1.515.01 при ФГАНУ «ВНИМИ»
Всероссийский
научно-исследовательский институт
молочной промышленности
г. Москва, ул Люсиновская, 35**

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора технических наук, доцента Китаевской Светланы Владимировны
на диссертационную работу Локачук Марины Николаевны на тему:
«Исследования микробиома заквасок и разработка микробного консорциума
для совершенствования технологии хлебобулочных изделий»,
представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по
специальностям 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически
активных веществ и 4.3.3 – Пищевые системы

Актуальность темы

Одной из основных задач национального проекта «Технологическое обеспечение биоэкономики» является обеспечение хлебопекарных производств отечественными стартовыми микробными консорциумами, обеспечивающими предсказуемость технологического процесса и высокое качество хлебобулочных изделий на заквасках.

Традиционные российские хлебопекарные технологии базируются на применении чистых культур промышленноценных микроорганизмов (дрожжи и молочнокислые бактерии), инициирующих спиртовое и молочнокислое брожение в заквасках. Внесение чистых культур обеспечивает быстрое превалирование заквасочных микроорганизмов над посторонней микробиотой, источником которой является хлебопекарное сырье с нестабильными микробиологическими показателями. Для поддержания заквасочных микроорганизмов в активном состоянии и формирования стабильного микробиома на предприятиях проводят регулярные освежения заквасок питательной смесью из муки и воды. Применение чистых культур заквасочных микроорганизмов позволяет получить хлеб с определенными органолептическими и физико-химическими характеристиками. Для эффективного использования сырья и ресурсосбережения, повышения качества хлебобулочных изделий и обеспечения здоровья населения должен осуществляться строгий контроль микробиоты заквасок. Однако до сих пор не проводилась видовая идентификация стартовых культур микроорганизмов и исследование микробиома заквасок при длительном их ведении

современными молекулярно-генетическими методами. Применение метагеномных подходов позволяет исследовать микробные сообщества заквасок без стадии культивирования и учитывать посторонние «нежелательные» микроорганизмы, а также минорные таксоны и некультивируемые микроорганизмы, способные играть важную роль в функционировании микробных экосистем.

В настоящее время часть предприятий малой мощности применяют закваски спонтанного брожения. Однако применение классических культуральных методов не позволяет произвести полную оценку микробного состава заквасок спонтанной ферментации. В процессе длительного ведения заквасок могут происходить значительные изменения таксономического состава микробиома, определяющие физико-химические и органолептические показатели качества хлеба. Поэтому является необходимым исследование динамики микробиома заквасок в процессе их длительного ведения. Следует подчеркнуть, что в отечественной научной литературе отсутствуют работы, посвященные исследованию динамики микробиома российских ржаных заквасок, что не позволяет оценить влияние сформировавшихся консорциумов на показатели качества заквасок и хлеба.

Перспективным направлением исследований является выделение новых штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей с высокими биотехнологическими свойствами из заквасок с устойчивым микробиомом для разработки новых отечественных заквасочных консорциумов, обеспечивающих повышение качества и безопасности хлебобулочных изделий и импортонезависимость хлебопекарных предприятий страны.

Формирование определенных ассоциаций микроорганизмов является актуальной задачей, поскольку позволяет управлять качеством закваски и выпекать хлеб с прогнозируемыми органолептическими и физико-химическими показателями. Однако, разработка новых заквасочных консорциумов невозможна без исследования биоразнообразия микробиома зрелых заквасок.

С учетом вышеизложенного, диссертационная работа Локачук Марины Николаевны, направленная на разработку микробного консорциума для совершенствования технологии хлебобулочных изделий, является своевременной и актуальной.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Цель исследования и поставленные задачи сформулированы по результатам анализа большого количества зарубежных и отечественных литературных источников. Это свидетельствует о всестороннем изучении исследований, направленных на изучение микробиома заквасок с направленным культивированием микроорганизмов и спонтанного брожения.

Изложенные в диссертации научные положения, выводы и рекомендации подтверждены значительным объемом полученных экспериментальных

данных и проведенных испытаний. Достоверность результатов, полученных при проведении исследований, определена количеством проведенных экспериментов, для реализации которых применялись микробиологические, физико-химические, органолептические методы исследования сырья, полуфабрикатов и хлебобулочных изделий, а также современные метагеномные методы, позволяющие охарактеризовать таксономический состав микробиома заквасок.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 13 международных научно-практических конференциях. По материалам диссертационной работы опубликовано 13 печатных работ, из которых 8 статей – в рецензируемых научных изданиях ВАК Министерства науки и высшего образования РФ. Тема и содержание работы соответствуют паспорту специальности 4.3.5. «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ» и 4.3.3. «Пищевые системы», а сделанные выводы – поставленной цели и задачам.

Научная новина, теоретическая и практическая значимость работы

Анализируя результаты проведенных экспериментальных исследований, сформулированные выводы и рекомендации, следует отметить **научную новизну**: проведена реидентификация промышленноценных штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, применяемых для выведения по разводочному циклу отечественных хлебных заквасок; продемонстрирована возможность применения высокопроизводительного секвенирования для исследования динамики изменения бактериального состава российских заквасок в процессе их ведения; установлено положительное влияние изменения состава микробиома густых ржанных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов на биотехнологические свойства заквасок и показатели качества ржаного хлеба; показано, что в зрелых заквасках спонтанной ферментации доминируют лактобациллы видов *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Limosilactobacillus pontis*, *Companilactobacillus paralimentarius*, которые вытесняют нежелательную микробиоту (*Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*), содержащуюся в муке, и способствуют улучшению биотехнологических свойств заквасок; экспериментально подтверждено влияние влажности и температуры ведения заквасок на состав микробиома на уровне семейства *Lactobacillaceae*; впервые выделен отечественный высокоактивный штамм лактобацилл вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, на основе которого разработан новый микробный консорциум, способствующий улучшению вкусо-ароматического профиля, замедлению черствения и повышению устойчивости к микробной порче хлебобулочных изделий, приготовленных на густой ржаной закваске.

Практическая значимость работы подтверждается разработкой:

1. ТИ по производству микробного консорциума на основе штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 и *K. humilis* Y128;

2. ТИ по приготовлению ржаной закваски «Деревенская» с использованием микробного консорциума на основе штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 и *K. humilis* Y128.

Подана заявка на патент № 2025135487 от 12.12.2025 г. «Новые стартеры для ржаных заквасок и способ их применения».

Результаты исследований использованы при формировании основополагающих терминов при создании отраслевого документа ГОСТ 32677- 2025 «Хлебопекарное производство. Термины и определения».

Проведена опытно-промышленная апробация выработки хлеба на густой ржаной закваске «Деревенская», выведенной с применением нового микробного консорциума на основе молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131 и дрожжей *K. humilis* Y128, на предприятиях ООО «Опытный хлебозавод» (г. Москва), ООО «Здоровый хлеб» (г. Санкт-Петербург).

Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней»

Диссертационная работа Локачук Марины Николаевны по структуре и оформлению соответствует требованиям, установленным к кандидатским диссертациям, имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, организации работы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста и содержит 32 рисунка, 31 таблицу и 11 приложений. Список литературы содержит 143 источника, в том числе 29 российских и 114 зарубежных авторов. Приведенные в диссертации рисунки и таблицы позволяют наглядно представить полученные экспериментальные данные и способствуют более полному пониманию ключевых аспектов работы. По объему, содержанию и сделанному заключению диссертация представляет завершенное исследование с последовательными и логичными выводами.

Автореферат и печатные работы Локачук М.Н. полностью отражают основные положения и содержание диссертационной работы.

Личный вклад соискателя состоит в обосновании необходимости исследования таксономического состава микробиома отечественных ржаных заквасок, постановке цели исследования и задач для ее реализации, проведении микробиологических анализов, статистической обработке и обобщении экспериментальных данных, апробации полученных результатов исследований, оформлении диссертации и подготовки материалов к опубликованию.

Оценка содержания диссертации и её завершённости

Во введении диссертации обоснована актуальность темы и проанализирована степень ее разработанности, изложены цель и задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Выделены научные положения, выносимые к защите, представлены методы исследований, степень достоверности результатов, сведения об апробации основных результатов работы и данные о научных публикациях автора по теме исследования, подтверждено соответствие диссертации паспорту научной специальности.

В главе 1 обзора научно-технической литературы представлены данные о таксономическом разнообразии бактерий и дрожжей в заквасках, отражена классификация заквасок по технологическим параметрам и способу формирования микробиома в отечественном и зарубежном хлебопечении, представлены результаты зарубежных исследований, посвященных изучению динамики микробиоты заквасок спонтанного брожения и с направленным культивированием микроорганизмов в процессе их ведения, показаны основные преимущества применения заквасок в технологии хлебобулочных изделий и технологические аспекты приготовления теста из ржаной муки. Представлены данные по отечественным и зарубежным микробным консорциумам, применяемым в хлебопекарной промышленности для выведения ржанных заквасок по разводочному циклу. Автором показано, что до настоящего времени метагеномные методы исследований не применялись для изучения таксономического состава микробиома российских заквасок. Отсутствие подобных исследований затрудняет разработку стандартизированных подходов к созданию новых микробных консорциумов и обеспечению стабильности технологического процесса, позволяющего гарантировать высокое качество и безопасность хлебобулочных изделий.

В главе 2 представлены организация экспериментов и структурная схема исследований, определены объекты исследований, представлены методы исследований, описаны способы приготовления полуфабрикатов и хлебобулочных изделий с применением ржаной муки. Приведены общепринятые и специальные методы исследований, необходимые для оценки физико-химических, микробиологических показателей сырья, полуфабрикатов и готовых изделий. Для исследования таксономического состава микробиома заквасок использован метод высокопроизводительного метагеномного секвенирования.

Логика организации экспериментов соответствует поставленным задачам.

В главе 3 представлены и детально описаны экспериментальные данные и проведено их обсуждение.

В разделе 3.1 представлены результаты исследования микробной обсемененности муки ржаной обдирной и обойной, полученные стандартными культуральными методами, а также состав прокариотных сообществ, определенный метагеномными методами. Автором показано, что

ржаная мука, выработанная разными изготовителями, различается по микробиологическим показателям и таксономическому составу микробиома.

В разделе 3.2 представлены результаты реидентификации промышленноценных штаммов молочнокислых бактерий, входящих в состав отечественных стартовых микробных композиций для приготовления ржаных заквасок по разводочному циклу, полученные в результате изучения сахаралитической активности штаммов и с помощью молекулярно-генетического метода. Представлены исследования изменения таксономического состава бактериального микробиома ржаных заквасок (густой и жидкой без заварки) с направленным культивированием микроорганизмов в процессе их ведения с помощью высокопроизводительного секвенирования. Определено влияние изменения состава микробиома заквасок на биотехнологические свойства полуфабрикатов и показатели качества ржаного хлеба.

Автором установлено, что внесение в водно-мучную питательную смесь стартовых культур лактобацилл ингибирует развитие нежелательной микробиоты, содержащейся в муке, что подтверждает положительное влияние чистых культур на направление процесса ферментации, а также способствует получению закваски с требуемыми биотехнологическими свойствами. Продемонстрировано, что в процессе последовательных освежений ржаных заквасок водно-мучной питательной смесью наблюдается вытеснение стартовых культур лактобацилл с заменой на другие виды лактобацилл. Показано, что изменение микробиома густой ржаной закваски приводит к улучшению физико-химических, органолептических показателей качества ржаного хлеба и повышению его устойчивости к плесневению.

В разделе 3.3 приведены результаты исследования таксономического состава микробиома ржаных заквасок (густой и жидкой без заварки) спонтанного брожения в процессе их ведения с помощью высокопроизводительного секвенирования. Определено влияние изменения микробиома заквасок на их биотехнологические свойства и показатели качества ржаного хлеба. Показано, что развитие в густых ржаных заквасках длительного ведения лактобацилл видов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и *Companilactobacillus paralimentarius*, а в жидких ржаных заквасках - *Limosilactobacillus pontis* и *Fructilactobacillus sanfranciscensis* способствует ингибированию «нежелательных» бактерий, содержащихся в муке (*Erwiniaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Microbacteriaceae*), способствующих появлению неприятного гнилостного запаха в молодых заквасках. Установлено, что закваски спонтанной ферментации могут быть применены для выработки хлеба через 10 суток ведения независимо от микробиологических показателей ржаной муки. Показано, что образцы хлеба ржаного из обдирной муки формового и хлеба ржаного «Простого», выработанные на зрелых заквасках спонтанного брожения, соответствуют требованиям нормативно-технической документации по физико-химическим и органолептическим показателям.

В разделе 3.4 разработан новый микробный консорциум для выведения густой ржаной закваски по разводочному циклу с улучшенными биотехнологическими свойствами. Для этого выделены из зрелых густых ржаных заквасок хорошего качества изоляты молочнокислых бактерий, изучены их морфологические и культуральные свойства. На основе скрининга биотехнологических свойств отобран штамм *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131. Штаммы указанного вида ранее отсутствовали в коллекции микроорганизмов для хлебопекарной промышленности и не входили в состав отечественных микробных консорциумов. Представлены результаты исследования влияния разработанного микробного консорциума на основе штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 и *K. humilis* Y128 на биотехнологические свойства густой ржаной закваски в течение одного месяца ведения. Установлено, что применение нового микробного консорциума способствует повышению титруемой кислотности и содержания летучих кислот в закваске разводочного цикла, что способствует улучшению ее органолептических показателей.

В разделе 3.5 представлены результаты исследования влияния густой ржаной закваски на новом микробном консорциуме на органолептические, физико-химические показатели качества хлеба ржаного и ржано-пшеничного заварного, а также их устойчивость к плесневению и меловой болезни. Автором показано, что хлебобулочные изделия, выработанные на густой ржаной закваске на новом микробном консорциуме, отличаются более высокими показателями качества и повышенной устойчивостью к микробной порче.

В разделе 3.6 разработаны технологические решения по применению микробного консорциума для выработки хлебобулочных изделий с использованием ржаной муки, технологическая схема приготовления и ведения ржаной закваски «Деревенская» на новом микробном консорциуме, технологическая схема производства хлеба из ржаной обдирной муки на густой ржаной закваске «Деревенская», приведен расчет экономической эффективности.

Выводы носят конкретный характер и соответствуют поставленным в диссертации задачам, научно обоснованы и подтверждены результатами лабораторных экспериментов и производственных испытаний.

Таким образом, основные положения диссертации подтверждены результатами экспериментальных работ, опытно-промышленной апробацией, получили развернутое и детальное обоснование в тексте работы.

Вопросы, замечания и рекомендации по содержанию и оформлению работы

При положительной оценке диссертации в целом следует отметить некоторые замечания:

1. В главе 2 при описании объектов и методов исследований, организации экспериментов часть значимой информации не представлена полно, так нет описания условий проведения процесса культивирования

молочнокислых бактерий и дрожжей и используемой для этого аппаратуры, отсутствует описание проведения органолептической оценки исследуемых образцов хлеба.

2. Требуется дополнительное пояснение, почему для выделения изолятов лактобацилл из заквасок используется среда San Francisco Medium Modified (SFM), а не MRS, предназначенную для этих целей. Следует пояснить с какой целью автор применяет питательные среды различного состава (SFM, MRS, сусло-агар) для одних и тех же целей – определения содержания клеток молочнокислых бактерий. При этом в работе приводится описание морфологии клеток и культуральные свойства выделенных автором лактобацилл только на среде SFM. Почему посеvy инкубировали при температуре 30 °С, оптимальной температурой роста представителей лактобацилл является 37 °С?

3. В работе использован термин «дрожжевое брожение» (стр. 82, 92, 113), который следует заменить на «спиртовое брожение».

4. Не совсем ясно, по каким критериям автором были отобраны изоляты молочнокислых бактерий №1, №3 и №4 для дальнейшей разработки консорциума (стр. 111). При отборе штаммов молочнокислых бактерий нет оценки их непатогенности.

5. Автору следует пояснить с какой целью варьировалось количество освежений закваски в производственном цикле в исследованиях по изучению влияния заквасок на показатели качества ржаного хлеба, так на стр. 87, 92, 94 количество освежений составляет 81-86, тогда как на стр. 116, 119 – 40-44.

6. В работе следовало бы привести биохимическую характеристику нового штамма *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131, депонированного в Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства ФГБНУ ВНИИСХМ под номером RCAM 06919. Автору следовало провести исследование на биосовместимость штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 и *K. humilis* Y128 общепринятым способом (капельным методом или методом штриха). В приложении к диссертации желательно приложить фотографии штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей, используемых в исследованиях.

7. Автором в технологической схеме производства хлеба из ржаной муки на закваске «Деревенская» указан температурный режим выпечки тестовых полуфабрикатов 200-260 °С (стр. 130), тогда как в актах апробации разработанной технологии на предприятиях ООО «Опытный хлебозавод» (г. Москва) и ООО «Здоровый хлеб» (г. Санкт-Петербург) приведена температура выпечки 190 °С (стр. 170) и 170 °С (стр. 174) соответственно.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научную и практическую значимость диссертации Локачук М.Н., а представленные к защите результаты позволяют их использовать в дальнейшей исследовательской и практической деятельности.

Заключение по диссертации

Диссертация Локачук Марины Николаевны на тему: «Исследования микробиома заквасок и разработка микробного консорциума для совершенствования технологии хлебобулочных изделий» представляет собой структурированное, законченное и самостоятельное научное исследование, выполнена на современном методическом уровне, имеет неоспоримую научную новизну и практическую значимость, соответствует пунктам 3, 28 паспорта специальности 4.3.5. «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ»; пункту 4 паспорта специальности 4.3.3. «Пищевые системы».

Диссертация Локачук М.Н. соответствует п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 в действующей редакции, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по научным специальностям 4.3.5. «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ», 4.3.3. «Пищевые системы».

Официальный оппонент:

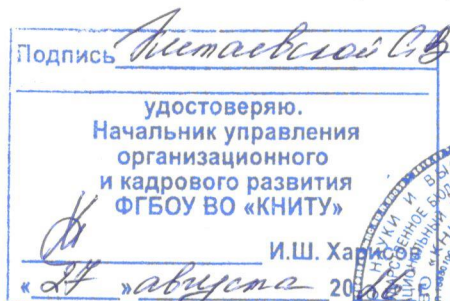
доцент, доктор технических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология, и.о. заведующего кафедрой «Пищевой биотехнологии»

Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Казанский национальный исследовательский
технологический университет»

Почтовый адрес: 420015, Казань, ул. Карла Маркса, 68

Тел.: +7(843)231-43-54

E-mail: KitaevskayaSV@corp.knrtu.ru



Светлана Владимировна Китаевская

Я, Китаевская Светлана Владимировна, даю согласие на обработку персональных данных, включение их в аттестационное дело Локачук Марины Николаевны, размещение отзыва на сайте ФГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» и на сайте ВАК РФ.