

## ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора технических наук, профессора Колпаковой Валентины Васильевны на диссертационную работу Хромовой Натальи Юрьевны «Биотехнологическая конверсия зернового сырья для получения пробиотических продуктов и кормовых белковых добавок, представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**Актуальность темы диссертации.** Еще в 1998 году Постановлением Правительства Российской Федерации от 10.08.1998 года N 917 была одобрена Концепция государственной политики в области здорового питания населения РФ на период до 2005 года, реализацией которой должно было стать улучшение структуры питания населения страны. Частично уже налажено производство отечественных продуктов функционального назначения, продуктов для вскармливания детей раннего возраста, школьного, спортивного питания и т.д. В 2005 году введен государственный стандарт «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения. ГОСТ Р 52349-2005». Развитие производства продуктов различного назначения, включая функциональное питание, осуществлялось, как правило, путем обогащения традиционных продуктов незаменимыми ингредиентами как синтетической, так и натуральной химической природы (витамины, минеральные вещества, пищевые волокна). Однако, несмотря на положительные тенденции в области питания населения, заболеваемость хроническими болезнями и ряда других явлений, связанных с алиментарным фактором, оставалась высокой, и значительно выше, чем в некоторых европейских странах. Поэтому далее разработаны «Основы государственной политики РФ в области здорового питания населения на период до 2020 года». За счет каких же мероприятий предполагается обеспечивать решение планируемых задач области здорового питания на новом этапе в рамках этих основ?

Это, прежде всего, расширение использования основных видов отечественного продовольственного сырья, отвечающих современным требованиям качества и безопасности, и второе - разработка и внедрение в пищевую промышленность, сельское хозяйство инновационных технологий, включая био- и нанотехнологии. Именно эти технологии приближают жизнь

человека к естественной среде обитания через создание пищевой и кормовой продукции с использованием микроорганизмов.

Оба эти положения положены в основу обоснования диссертантом актуальности проблемы, как и то, что поставленные задачи решались через конкретные процессы глубокой переработки зернового сырья, в частности, пшеницы, занимающей лидирующее положение в объеме производства зерновых культур. Научнообъемные биоконверсионные процессы обеспечивают добавленную стоимость, расширенный ассортимент конечной продукции, уменьшение количества вторичных сырьевых ресурсов (сточных вод) и т.д. и одновременно решают проблему пополнения ресурсов кормового, а через него - и пищевого белка с разработкой продуктов питания функционального назначения.

Всем этим тенденциям актуальности, как в научном, так и практическом плане, в полном объеме и отвечает диссертационная работа Хромовой Н. Ю., через разработку основ технологии получения функциональных ингредиентов и продуктов питания, содержащих бифидо-, лактобактерии, белковых кормовых добавок путем биоконверсии зернового возобновляемого крахмалосодержащего растительного сырья.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках гранта РФФИ (№ 16-19-10469), идентификатора проекта RFMEFI62614X0003 Минобрнауки и соглашения о предоставлении субсидии (№ 14.626.21.0003 от 17.11.2014).

**Новизна научных исследований, результатов, выводов, рекомендаций** заключается в:

- доказательстве значения ферментативного гидролиза зернового сырья не только с амилолитическим препаратом (Duozym), но и протеолитическим (Protex 40E) для получения функциональных ингредиентов, содержащих бифидо- или лактобактерии, в отличие, например, от известных литературных данных относительно повышения выхода белковых препаратов из зернового сырья и вторичных продуктов его переработки (Пищевая промышленность, 2018. №9. С.30-33).
- получении сравнительных данных роста микроорганизмов на различном составе питательной среды из муки, полученной из различных видов зерновых культур (пшеничной, ржаной, гречневой, гороховой) и установлении наиболее



эффективной среды для их роста (пшеничной, ржаной). Определении повышенных количеств в среде содержания молочной кислоты при ферментативной обработке амилазами;

- получении данных по закономерностям 48 ч роста лактобактерий на гидролизатах, полученных из обойной муки и муки высшего сорта с использованием протеаз 3-х видов ферментных препаратов (ФП) и доказательстве преимущества использования муки с более высоким выходом, по количеству жизнеспособных клеток лактобактерий. Данные положены в основу научного обоснования использования экономически более выгодных ФП Protex 40E и Olexa, по сравнению с ФП Протосубтилин ГЗХ;

- выявлении особенностей ростовых признаков при культивировании молочнокислых бактерий на суспензии из обойной пшеничной муки, обработанной амилазами и протеазами, с доказательством преимущества применения *L. rhamnosus* и *L. Paracasei* (титр не менее  $3 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>);

- создании математической модели (уравнения) для подсчета количества молочнокислых бактерий в 1 см<sup>3</sup> культуральной жидкости в зависимости от гидромодуля и концентрации ФП Protex 40E при использовании культуры *L. Rhamnosus*;

- доказательстве соответствия ростовых свойств питательных сред на основе мучных гидролизатов по конечному содержанию бифидо- или лактобактерий (до  $10^8 - 10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>) свойствам, полученным на стандартной среде MRS и получении закономерностей роста *L. Rhamnosus* и *B. Adolescentis*;

- установлении зависимости количества жизнеспособных клеток в условиях *invitro*, моделирующих процессы желудочно-кишечного тракта, от воздействия среды искусственного желудочного сока и желчных кислот, доказано, что наиболее устойчивой культурой к воздействию кислого рН явилась культура *L. Bulgaricus*, к желчи - культура *L. Plantarum*, тогда как в условиях хранения зернового напитка в течение 5 недель - культура *L. Rhamnosus*;

- доказательстве возможности культивирования *Bifidobacterium bifidum* №1 и *B. Adolescentis* с наибольшей эффективностью на средах с гидролизатом пшеничной муки, взамен компонентов животного происхождения, при использовании для гидролиза ФП Панкреатина и компонентов среды MRS-C; создании

математической модели ферментации пшеничной муки для культивирования бифидобактерий с используемыми факторами: концентрацией ФП; гидромодулем; рН; температурой;

- установлении факта выживаемости бифидобактерий в процессе лиофильной сушки при использовании в качестве криопротектора гидролизата пшеничной муки, полученного при оптимальных условиях, взамен известного обезжиренного молока;

- научном обосновании эффективных показателей биоконверсии побочного продукта переработки зерна пшеницы на крахмал и клейковину (пентозановой фракции), при использовании смешанной культуры дрожжей *Candida utilis* и *Leucosporidium scottii*: результаты скрининга штаммов микроорганизмов по способности метаболизировать ксилозу, арабинозу и данные максимальной концентрации клеток, накопления биомассы.

**Научно-практическая значимость** полученных результатов состоит в:

- разработке технологических решений биологической трансформации продукта переработки зерна пшеницы в пробиотические функциональные ингредиенты и напитки, включающих: обоснование выбора сырья (пшеничная, ржаная мука), сорта пшеничной муки (обойная), ФП как источника амилаз, протеаз (Duozym, Protex 40E, соответственно), рода лактобактерий (*Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus Paracasei*) для обеспечения максимального содержания живых пробиотических микроорганизмов (не менее  $10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>), разработку оптимальных параметров процесса гидролиза компонентов муки: гидромодуль, концентрация ФП (2% от массовой доли белка в муке) без использования дополнительных соединений, по сравнению с известными средами, обеспечивающие ростовые свойства, характерные для стандартной среды MRS;

- доказательстве использования в качестве защитной среды в лиофильной сушке *Bifidobacterium adolescentis* гидролизата пшеничной муки для обеспечения получения продукта с содержанием бактерий не менее  $10^{10}$  КОЕ/г, при показателе выживаемости 90%;

- разработке технологических параметров ферментации лактобактерий на гидролизате обойной пшеничной муки для создания пробиотических напитков с



содержанием лактобактерий  $10^8$ – $10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>, надлежащими сенсорными показателями качества и хранимоспособностью;

- разработке гибкой принципиально-технологической схемы переработки зерна пшеницы в пищевые продукты/ингредиенты, содержащие пробиотики;
- разработке технологии биоконверсии вторичного продукта глубокой переработки зерна пшеницы (пентозановой фракции) с использованием смешанной культуры дрожжей *S. utilis* и *Leucosporidium scottii* в белковую кормовую добавку (БКД) с содержанием не менее 54 % сырого протеина на СВ, определении минерального состава питательной среды с пентозановой фракцией, разработке параметров культивирования смешанной культуры дрожжей на среде с пентозановой фракцией (скорость протока в отъемно-доливном режиме, концентрация ФП Duozyme и т.д.);
- проведении клинических испытаний на животных (крысах), совместно с ФГБНУ «ВНИИВСГЭ» и доказательстве принадлежности БКД к 4 классу опасности (малоопасное соединение) в условиях перорального введения; разработке технологической схемы биоконверсии пентозановой фракции пшеницы с получением белковой кормовой добавки для животных;
- в подтверждении практической значимости технологических решений результатами апробации технологии БКД на пилотной установке предприятия ЗАО «Завод Премиксов №1», в соответствии с разработанным регламентом, что отражено в Акте наработки опытной партии;
- в выполнении технико-экономических расчетов от внедрения технологий пробиотического напитка, при мощности производства 600 тонн/год, и ингредиента при 8,5 тонн/год, показавших срок окупаемости 2,6 и 1,0 год, соответственно, а при переработке 20000 тонн/год сырья для производства белковой кормовой добавки - 10,5 лет.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций, заключений** подтверждается достаточно большим количеством экспериментов с полным, детальным описанием процедур, предусмотренных широким спектром стандартных, общепринятых и специальных биохимических, физико-химических, биотехнологических методов исследования (хроматографических (ВЭЖХ), спектральных, аналитических, в частности, потенциометрических, микробиологических, определением острой токсичности с

применением тест культуры инфузорий *Tetrachymena pyriformis*). Важно отметить подробное описание методики эксперимента, что обеспечивает возможность воспроизведения результатов, полученных диссертантом, и подтверждения их достоверности. Научные результаты экспериментальных данных обработаны методами математической статистики, включая представления их массива графическим (пространственным) изображением, на основании чего положения и выводы по результатам следует считать аргументированными, обоснованными и достоверными.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа Хромовой Н.Ю. изложена на 167 страницах печатного текста. Она включает 38 таблиц, 32 рисунка и 5 Приложений, отражающих результаты хроматографического анализа углеводов пентозановой фракции (Приложения 1, 2), лист Заявки на получение Патента (Приложение 3), Титульный лист лабораторного регламента (Приложение 4) и Акт наработки опытной партии БКД (Приложение 5). Научно-квалификационная работа, отражающая результаты научных исследований автора и представленная на соискание ученой степени в виде рукописи и автореферат, оформлены в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011. Диссертация включает: титульный лист; оглавление (с 2 по 5 страницу); текст диссертации: введение (с 6 по 10 страницу), основную часть, состоящую из обзора литературы (с 11 по 52 страницу), экспериментальной части (с 53 по 144 страницу); заключения (выводов) (с 145 по 146 страницу); списка литературы (с 147 по 163 страницу); приложений (с 164 по 167 страницу). Список литературы включает 163 наименований отечественных и зарубежных источников, из которых 92 – зарубежных (57 %) и 63 – опубликованных за последние 10 лет (39 %). Важно отметить, что содержание литературного обзора в полной мере отражают содержание экспериментальной части и включает в себя 7 разделов с подразделами. Литературные данные критически проанализированы и увязаны с задачами проведения эксперимента.

Работа аккуратно оформлена, написана грамотным, логичным и последовательным стилем и языком с представлением коротких выводов по каждому разделу, являющихся обоснованием перехода к следующему этапу исследований достаточно большой по объему выполненной диссертационной работы. Рисунки, таблицы и схемы наглядно отражают полученные



экспериментальные данные без дублирования их содержания в текстовой части, которая, в свою очередь, отражает исключительно анализ и обсуждение полученных результатов.

Из результатов, полученных диссертантом Хромовой Н.Ю. как наиболее значимые, отмечу научные данные и практическую значимость биоконверсионной утилизации пентозановой фракции - вторичного продукта переработки зерна пшеницы на крахмал и клейковину. Отмечу данные скрининга штаммов дрожжей для биоконверсии данной фракции, разработку способа подготовки фракции с исключением кислотного гидролиза и ферментативной обработки для повышения биодоступности ее компонентов, результаты исследования хроматографического состава углеводов (ТСХ и ВЭЖХ), доказывающие, что в питательной среде, наряду с глюкозой, мальтозой, содержатся пентозы – ксилоза, арабиноза, галактоза, что и определяет использование выбранных *Leucosporidium scottii* ОН-1 и *Candida utilis* Y-3348.С. Обращает на себя внимание определение диссертантом показателей безопасности БКД, установление максимальной дозы при отсутствии острой токсичности при введении ее в организм животных (на примере крыс) (7,0 г/кг) и результаты исследования стабильности лактобацилл в функциональном напитке при хранении в условиях, моделирующих прохождение через желудочно-кишечный тракт (*in vitro*).

В качестве замечаний следует отметить, что:

1. Логичнее было бы изменить порядок подразделов Литературного обзора, поставив под № 1.1 раздел не «Состояние и перспективы развития зернового производства в Российской Федерации», а «Концепцию функционального питания», обозначенного диссертантом в тексте под № 1.3. Далее под № 1.2 расположить «Концепцию пробиотиков и их роль в оздоровлении человека», а далее уже излагать пути достижения стоящих перед населением страны задач в этой области, используя наличие сырьевой базы зернового хозяйства страны и попутно решая задачи в области рационального использования сырья через биоконверсию продуктов его переработки, включая вторичные, с получением основных ингредиентов (крахмал, клейковина и т.д.). И под № 1.3 - пункт «Состояние и перспективы развития зернового производства в Российской Федерации».

Федерации», под № 1.4 – «Химический состав и биологическая ценность крахмалсодержащего зернового сырья» и далее по тексту;

2. Часть литературных источников относится к ранним годам издания (20-50 лет назад), но, если учесть, что они содержат методы исследований, впервые описанные в изданиях, авторами которых являются такие известные ученые, как проф. Козьмина Н.П., Кретович В.Л., Lowry et al., Збарский Б.И., то указание данных пунктов, вероятно, следует считать обоснованными (п.п. 11-13, 140, 141 и др.). В то же время часть литературы, изданной в 80-90 годы, можно было бы заменить на более новую;

3. Понятие «биологической ценности» используется не в соответствии с его сущностью. Так на стр. 129 указано, что «Результаты оценки биологической ценности гидролизатов и влияния кислотности на качество получаемого субстрата представлены в таблице 3.3.3.1», тогда как приводятся данные по влиянию рН гидролиза серной кислотой пентозановой фракции на рост смешанной культуры дрожжей (концентрацию углеводов, накопление биомассы и т.д.). Биологическая ценность относится к оценке качества белка — это эффективность его утилизации для поддержания азотистого равновесия в организме и зависит она от содержания незаменимых аминокислот и оценивается биологическими или химическими методами, в частности, аминокислотным скором;

4. Названия некоторых таблиц, как правило, отражают не параметры процессов, а название самих процессов, приводящих к достижению тех или иных параметров. Например, Таблица 3.1.1.1 «Ферментация *L. paracasei* на необработанных суспензиях различных сельскохозяйственных культур». Следовало, например, обозначить как «Влияние различных видов сельскохозяйственных культур и ФП на параметры процесса ферментации» (рН, начальное содержание общих углеводов, г/л и т.д.); Таблица 3.1.2.1. «Культивирование лактобактерий на гидролизатах пшеничной муки, полученных при обработке ФП Protex 40E» вместо, например, «Влияние сорта и концентрации ФП на параметры культивирования лактобактерий» и т.д.;

5. В таблицах, как и по тексту, целесообразно при описании значений показателей, вместо слова «Содержание» указывать «Массовая доля»: Массовая доля углеводов, %», «Массовая доля белка, %», «Массовая доля РВ, %) и т.д.



(Таблица 3.1.3.1, Таблица 3.1.2.4, Таблица 3.2.2.5 и т.д.). Для обозначения «мл» и «л» целесообразно использовать систему СИ: см<sup>3</sup> и дм<sup>3</sup>, соответственно.

6. В качестве пожелания – продолжить работу по более полной характеристике пищевой и кормовой ценности разработанных продуктов, ингредиентов, БКД (состав липидной фракции, аминокислотный, минеральный состав и т. д).

**Общая характеристика диссертационной работы.** Указанные замечания не снижают ни научной ценности, ни практической значимости выполненной работы диссертантом Хромовой Н.Ю. Автореферат и научные публикации в виде печатных работ полностью отражают содержание диссертации. Отмечается широчайшая апробация результатов, вынесенных на защиту диссертантом: на отечественных Международных конгрессах, форумах, посвященных процессам биотехнологии: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева – Москва, 2015; ООО «РЭД ГРУПП», Москва, 2018; Международной конференции молодых ученых, Казань, 2016 ; Международные научно-практические конференции (Ставрополь, 2016 г., Новосибирск, 1917 г); XI Конкурс проектов молодых ученых в рамках выставки «Химия-2017»; опубликованных в журналах «Успехи в химии и химической технологии», «Актуальная биотехнология». Автором диссертации опубликовано 5 печатных трудов в изданиях, рекомендуемых ВАК: «Буллеровские сообщения» и 4 работы в Трудях 16-18 th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM (Albena, Bulgaria), размещенных в базе научного цитирования Scopus с представлением устных и стендовых докладов. Поданы заявочные материалы на выдачу 1 патента РФ.

Диссертантом работа представляет собой завершенное научное исследование, включающее обоснование актуальности намеченных целей и задач по разработке основ гибкой технологии получения функциональных продуктов и ингредиентов, содержащих бифидо- и лактобактерии и белковых кормовых добавок путем биоконверсии зернового возобновляемого крахмалосодержащего растительного сырья (пшеничной муки и вторичного продукта переработки зерна пшеницы на крахмал и клейковину - петозановой фракции), выполнение эксперимента и представление достоверных обобщенных результатов, выводов (заключения) и рекомендаций.

В целом, диссертационная работа Хромовой Н.Ю. соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842), в частности соответствует

паспорту специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в части п. 3 «Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза 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».

Работа представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой представлено новое оригинальное решение задачи биоконверсии продуктов переработки зерна пшеницы на пищевые и кормовые цели с научным обоснованием использования пробиотических культур, с учетом особенностей химического, биохимического состава сырья, наличия ресурсов и экономического эффекта для создания функциональных пробиотических ингредиентов, напитков, белковых кормовых добавок, имеющих существенное значение для развития биотехнологии, пищевой и перерабатывающей промышленности.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Хромовой Н.Ю. по актуальности темы, объему выполненной теоретической, экспериментальной части, новизне полученных данных и выводов для практической реализации сформулированных заключений, по качеству и количеству публикаций полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции от 01.10.2018), а ее автор Хромова Наталья Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Колпакова Валентина Васильевна,  
доктор технических наук, профессор  
ВНИИ крахмалопродуктов – Филиал ФГБНУ  
«Федеральный научный центр пищевых  
систем им. В.М. Горбатова», заведующая отделом  
биотехнологии крахмалопродуктов  
140051, Московская область, Люберецкий район,  
Красково, ул. Некрасова, 11  
тел.: +7 (495) 557-15-00; +7 (915) 285 84 50  
E-mail: val-kolpakova@rambler.ru

Колпакова  
Валентина  
Васильевна

*Подпись Колпаковой В.В. подвержено.*  
*Вед. специалист*  
*23.05.2019*

