

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Радиф Зейд Халоф Радиф «Разработка биотехнологии маннозы и маннозосодержащих гидролизатов из растительного сырья и исследование их биологических функций», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности: 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

**Актуальность работы.** Диссертационная работа направлена на решение актуальной проблемы - разработку биотехнологии маннозы и маннозосодержащих гидролизатов, промышленное производство которых отсутствует как у нас в стране, так и за рубежом. Манноза является «минорным» сахаром, входит в состав иммуноглобулинов, участвует в синтезе гликопротеидов, обладает пребиотическим действием. Недостаток этого углевода в крови приводит к аномальному гликозилированию иммуноглобулинов с нарушенной структурой углеводной части, а также нарушению синтеза других гликопротеидов. Манноза в пищевых продуктах присутствует в виде гомогенных или гетерогенных полисахаридов, в том числе растительного происхождения. Для получения маннозы и манноолигосахаридов, представляющих интерес для пищевой и кормовой промышленности, перспективным является применение ферментного препарата  $\beta$ -маннаназы, расщепляющего внутренние  $\beta$ -1,4-гликозидные связи в маннанах растительного сырья. В этой связи представленная к защите диссертационная работа весьма актуальна.

Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть и обсуждение результатов (2 главы), заключение, выводы, список использованных источников, приложения. Работа содержит 116 страниц машинописного текста, 40 таблиц, 25 рисунков. Библиографический список включает 111 наименований. Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК.

Во введении обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследований, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе проведен обзор опубликованных данных по строению и содержанию маннанов в растительном сырье. Рассмотрены микроорганизмы- продуценты  $\beta$ -маннаназы, физико-химические свойства продуцируемых ферментов. Рассмотрены способы получения маннозы и биологические функции маннозы и манноолигосахаридов. Дана общая характеристика микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы, показана возможность ее коррекции при применении веществ пребиотического действия.

Проведенный анализ публикаций позволил автору достаточно объективно сформулировать задачи для достижения поставленной цели в диссертации.

Во второй главе в соответствии с задачами для достижения цели автор обоснованно выбрал объекты и методы исследования.



Автором использованы современные биохимические, микробиологические, аналитические методы исследования, применены методы статистической обработки экспериментальных данных.

Автор использует в своей работе выпускаемые промышленностью спиртоосажденные ферментные препараты:  $\beta$ -маннаназа *Trichoderma harzianum* F114 и рекомбинантная  $\beta$ -маннаназа *Bacillus subtilis*, бифидобактерии *Bifidobacterium bifidum* – коммерческий препарат «Бифидумбактерин», что гарантирует освоение в промышленности технологии маннозы и маннозосодержащих жидкостей. Проведен достаточно точные качественные анализы продуктов гидролиза маннанов методом тонкослойной хроматографии количественное определение сахаров на сканирующем денситометре SAMAG TLC Scanner 3 (Швейцария).

Проводились исследования *in vivo* на лабораторных мышах массой 14-16 г, полученные из филиала института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; на цыплятах-бройлерах кросса "Смена-2" 11-суточного возраста весом 220-230 г. Бифидогенные свойства маннозы изучались при сравнении и совместном применении с коммерческими пробиотиками «Лактобактерин» и «Бифидумбактерин».

Факторы неспецифического иммунитета при коррекции экспериментального дисбиоза в сыворотках крови животных определяли с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем производства «Bio-Source», Бельгия. Коммерческий набор OptEIA™ ELISA Kit, USA использовали для определения уровня фактора некроза опухоли TNF- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ).

Исходя из рекомендуемой нормы потребления пребиотиков и пробиотиков для человека в день, автор рассчитал дозировки маннозы и количество пробиотических препаратов белых беспородных мышей.

Полученные результаты исследований и их обсуждение представлено в третьей и четвертой главах. Соискателем подобраны маннансодержащее растительное сырье и ферментный препарат  $\beta$ -маннаназы для получения маннозосодержащих гидролизатов, определен их качественный и количественный состав. Разработан лабораторный регламент получения маннозосодержащих гидролизатов. Исследованы пребиотические свойства маннозы в опытах *in vitro* и *in vivo* и маннозосодержащих гидролизатов в опытах *in vivo*, а также изучено влияние маннозы на факторы неспецифического иммунитета опытных животных.

Для оценки конкурентоспособности предлагаемой технологии был произведен расчет себестоимости 1 г маннозосодержащих гидролизатов. Который показал, что отечественный препарат маннозосодержащих гидролизатов является конкурентоспособным на рынке.

**Достоверность и обоснованность результатов и основных выводов диссертации.** Автором диссертации выполнен большой объем научных исследований, в результате которых получен систематизированный экспериментальный материал. Содержащиеся в работе результаты исследований, выводы и рекомендации научно обоснованы, опираются на полученные автором экспериментальные данные и являются их логическим следствием. За-



службой соискателя является подбор и анализ большого массива научной литературы, среди которой две третьих списка принадлежит иностранным источникам.

Объективность полученных результатов подтверждается также использованием современных наукоемких методов, применением математической статистики для обработки данных. Полученные в работе результаты являются обоснованными и объективными. Выводы аргументированы, вытекают из содержания проведенных исследований и подтверждены в производственных условиях.

Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на международных и региональных научно-практических конференциях и съездах ученых.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 8 работ, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Содержание автореферата находится в полном соответствии с диссертацией и отражает ее основные положения.

**Научная новизна** работы заключается в следующем.

Разработана биотехнология маннозосодержащих гидролизатов из древесных опилок. Установлены оптимальные условия гидролиза глюкоманнана древесных опилок под действием  $\beta$ -маннаназы *B. subtilis*, обеспечивающие степень гидролиза глюкоманнана 88 %, и определен качественный и количественный состав полученных маннозосодержащих гидролизатов. Впервые показано, что маннозосодержащие гидролизаты стимулировали развитие *B. bifidum* в большей степени, чем манноза и не уступали по действию известному коммерческому пребиотику инулину. Установлена способность манно-олигосахаридов различной степени полимеризации к нормализации микрофлоры ЖКТ цыплят-бройлеров с экспериментальным дисбиозом.

Диссертация содержит научную новизну соответствующую пунктам 2,3,4 паспорта специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

**Практическая значимость.** Разработана биотехнология маннозы и маннозосодержащих гидролизатов из растительного сырья, основанная на ферментативном гидролизе глюкоманнанов древесных опилок  $\beta$ -маннаназой. Установленная способность маннозы индуцировать экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов свидетельствует об иммуностимулирующих свойствах и перспективах использования маннозосодержащих гидролизатов в качестве иммуностимуляторов. Восстановление состава и численности основных представителей индигенной кишечной микрофлоры при введении в основной рацион цыплят-бройлеров с антибиотикоассоциированным дисбиозом маннозосодержащих гидролизатов свидетельствует о перспективах их применения для коррекции микробиоценоза ЖКТ цыплят. Маннозосодержащие гидролизаты могут найти применение в пищевой и кормовой промышленности для получения функциональных продуктов и кормовых добавок с иммуностимулирующим и пребиотическим действием.



**Автор рекомендует** перспективный источник растительного сырья для получения маннозы и манноолигосахаридов - ель обыкновенную, для получения маннозы и манноолигосахаридов из глюкоманнана древесных опилок использовать  $\beta$ -манназу *B. subtilis* 168, вносить маннозосодержащие гидролизаты в количестве 1 % к массе корма при экспериментальном дисбиозе у цыплят.

**Замечания по диссертационной работе.** Вместе с тем, при рассмотрении диссертационной работы возникли вопросы и имеются замечания:

1. Автор показал, что маннозосодержащие гидролизаты стимулируют развитие *B. bifidum* в большей степени, чем манноза и не уступают по действию известному коммерческому пребиотику – инулину (*Raftiline*). Возникает вопрос. Какие вещества в гидролизатах, кроме маннозы, приводят к такому положительному эффекту?

2. На стр. 42 автор констатирует, что «Использование маннанов ограничено из-за трудности их разложения на компоненты, которые могут усваиваться живыми организмами в качестве источника энергии или проявлять другие полезные свойства». Необходимо пояснить, какие и чем вызваны эти трудности.

3. На стр. 46 автор ссылается на установленные рациональные параметры гидролиза глюкоманнанов ели обыкновенной... Однако, далее приводит оптимальные параметры этого процесса. Возникает вопрос. Занимался ли автор оптимизацией параметров ферментативного гидролиза маннанов или проводил классические эксперименты?

4. На схеме производства маннаносодержащих гидролизатов из древесных опилок необходимо указать побочные (вторичные) продукты, образующиеся при получении маннозы. И пояснить возможные пути их использования в биотехнологической или других отраслях промышленности. Какие вещества содержатся в не растворимом осадке глюкоманнанов, который затем гидролизует  $\beta$ -манназой? (схема на стр. 50).

5. Обладают ли побочными активностями рекомбинантный ферментный препарат  $\beta$ -манназы *B. subtilis* и ферментный препарат  $\beta$ -манназы *Tr. Harzianum*? Указать какими? Возможно, эти активности способствуют образованию мономеров углеводов, кроме маннозы, в маннозосодержащих гидролизатах, повышающих эффект воздействия на *B. Bifidum*?

6. Нет ссылки на источник, который рекомендует хвойные породы древесины делигнифицировать надуксусной кислотой при температуре 75-85°C в течении 30 мин, чтобы сохранять гемицеллюлозный комплекс.

7. Получение маннозосодержащих гидролизатов в промышленных условиях по технологической схеме (рис. 3.5) потребует значительного количества воды на промывку субстрата перед обработкой рекомбинантным ферментным препаратом  $\beta$ -манназы *B. subtilis* и ферментным препаратом  $\beta$ -манназы *Tr. Harzianum*. В этой связи возникает вопрос о возможности применения в технологии получения маннозосодержащих гидролизатов  $\beta$ -манназы с оптимальными значениями pH от 8,0 до 10,0, продуцентами которых являются *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus* AM001, *Bacillus* sp. N 16-5



(таблица 1.2). Какая перспектива применения этих ферментных препаратов в технологии маннаносодержащих ферментных препаратов из древесного сырья.

8. Встречаются опечатки. В частности, на стр.51 слово «описка» вместо «опилки». На стр. 85 вместо фразы с сокращением «про- и противовоспалительные цитокинины», желателно записать «провоспалительные и противовоспалительные цитокинины».

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научную и практическую значимость проведенных теоретических и экспериментальных исследований.

**Заключение.** В представленной диссертационной работе изложены научно обоснованные технологические и технические решения для производства манносодержащих гидролизатов из растительного сырья ферментативным методом для получения пищевых и кормовых продуктов с иммуностимулирующими и пребиотическими свойствами, Диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на современном методическом уровне. Выводы и рекомендации диссертационной работы теоретически обоснованы. Представленные результаты исследований актуальны, имеют прикладное значение.

Диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (ред. от 01.10. 2018 г.), предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. Считаю, что Радиф Зейд Халов Радиф заслуживает присуждение ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:  
кандидат технических наук, доцент  
кафедры пищевой биотехнологии  
Федерального государственного  
бюджетного образовательного учре-  
ждения высшего образова-  
ния «Казанский национальный ис-  
следовательский технологический  
университет» (ФГБОУ ВО «КНИ-  
ТУ»)

420015, Российская Федерация,  
Республика Татарстан,  
Казань, ул. К. Маркса, 68,  
E-mail: zosya\_kanarskaya@mail.ru  
Телефон: +79600471908

Канарская Зоя Альбертовна

Подпись Канарской З.А.



удостоверяется.

Заведующий ОКид ФГБОУ ВО «КНИТУ»

О.А. Перельгина

20.8.