

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата технических наук
Фоменко Ивана Андреевича на диссертационную работу

Базулевой Викторией Александровны

«Свойства и практическое применение белково-фосфатного комплекса,
полученного из *Phaseolus vulgaris* (*Kidney bean*)»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы диссертации. Диссертационная работа В.А. Базулевой посвящена актуальной теме: изучению свойств и практического применения белково-фосфатного комплекса, полученного из бобового растительного сырья – фасоли сорта Кидни. Поскольку роль белков в природе велика, они находят применение во многих пищевых и кормовых производствах, фармацевтической промышленности и др. Автором предлагается использовать белково-фосфатный комплекс как консервант зерна, что является новым направлением для применения белков в биологической защите растений. Актуальность темы бесспорна и обусловлена тем, что решение поставленных задач связано с разработкой технологии для получения белково-фосфатного комплекса из *Phaseolus vulgaris*, что позволяет получать продукт с высоким выходом и максимальными параметрами для влияния на физиологические процессы зерна при проращивании. Вышеперечисленное обуславливает научную значимость диссертационной работы, а, следовательно, актуальность работы В.А. Базулевой не вызывает сомнений.

Целью диссертационной работы В.А. Базулевой является получение белково-фосфатного комплекса из *Phaseolus vulgaris* (*Kidney bean*) и изучение его физико-химических и биологических свойств для определения потенциального использования в качестве консерванта фуражного зерна.

Для достижения поставленной цели были сформированы следующие задачи:

- разработать способ получения белково-фосфатного комплекса из семян фасоли, обладающего ингибиторной активностью по отношению к амилазам;
- изучить влияние ультразвукового воздействия на состав и свойства получаемого белково-фосфатного комплекса;
- изучить физико-химические свойства белково-фосфатного комплекса;
- изучить влияние полученного белково-фосфатного комплекса на амилазы *Aspergillus oryzae* и панкреатическую амилазу, а также на амилазы семян фуражного зерна при проращивании;
- определить потенциальную возможность использования белково-фосфатного комплекса в качестве консерванта фуражного зерна и оценить влияние белково-фосфатного комплекса на фитопатогенную микрофлору при прорастании зерна;
- подобрать концентрации белково-фосфатного комплекса для использования его в качестве консерванта при обработке фуражного зерна.

Все сформулированные цель и задачи успешно выполнены соискателем в ходе проведенных многопрофильных научных исследований.

Диссертационные исследования имеют практическое значение для получения белковых веществ из бобового сырья, и для дальнейшего использования полученного продукта в качестве объекта биотехнологического и сельскохозяйственного назначения.

Научная новизна исследования. Базулевой В.А. в диссертационной работе впервые использован белково-фосфатный комплекс как консервант фуражного зерна при хранении. Также предложен способ для получения белково-фосфатного комплекса, включающий ультразвуковую обработку, которая оказывает значительное влияние на химический состав и биологическую активность полученного продукта. Соискателем были охарактеризованы физико-химические свойства белково-фосфатного комплекса (химический состав, термические характеристики, размеры белковых частиц) и особое внимание уделено ингибиторной активности по отношению к амилазам различного происхождения и влиянию на комплекс амилаз зерна ржи сорта «Дымка». Подавление прорастания происходит при использовании полусухого способа обработки фуражного зерна с содержанием белково-фосфатного комплекса 340 ± 2 мг/г. В результате проведенных исследований было установлено, что благодаря обработке белково-фосфатным комплексом снижается зараженность зерна грибами. Диссертационная работа является актуальной, а полученные результаты обладают научной новизной и практической значимостью. По своей направленности, тематике и методологии исследований работа полностью соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология.

Теоретическая и научно-практическая ценность полученных результатов. Представленная работа является фундаментальным и прикладным исследованием, которое может быть рекомендовано в сельском хозяйстве для разработки композиции, обладающей амилазной активностью для снижения численности фитопатогенной микрофлоры не только на фуражном зерне, но и на других культурах. Полученные результаты являются теоретической основой для обоснования физиологических процессов, происходящих в прорастающем зерне, при воздействии белковых ингибиторов. Разработанный способ получения белково-фосфатного комплекса из фасоли, обладающего ингибиторной активностью по отношению к α -амилазам, может являться базой для дальнейших исследований в области извлечения белоксодержащих веществ из растительного сырья. Выявленные закономерности влияния ультразвука на белково-фосфатный комплекс позволяют получить целевой продукт с более высокой ингибиторной активностью.

Результаты исследований были объединены в виде патента на изобретение.

Степень обоснованности и достоверность полученных результатов исследования. Достоверность полученных результатов подтверждается большим массивом экспериментов и достаточным количеством повторений. Полученные результаты оформлены должным образом, убедительны, а также проанализированы с учетом данных отечественных и зарубежных научных источников.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработка способа получения белково-фосфатного комплекса, обладающего ингибиторной активностью по отношению к амилазам зерна, α -амилазе *Aspergillus oryzae*, панкреатической амилазе;
2. Влияние ультразвука на изменение физико-химических свойств белково-фосфатного комплекса и увеличение ингибиторной активности;
3. Ингибирование белково-фосфатным комплексом α -амилаз *Aspergillus oryzae*, панкреатической амилазы и амилаз ржи;
4. Результаты обработки фуражного зерна, полученным белково-фосфатным комплексом и оценка влияния белково-фосфатного комплекса на прорастания семян зерновых культур и фитопатогенных грибов.

Положения, выносимые на защиту, определялись результатами, полученными соискателем в процессе разнообразных исследований. Они соответствуют цели и задачам проведенной работы. Обсуждение результатов исследований осуществлялось с привлечением большого количества оригинальных источников.

Публикация и апробация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ, в том числе 2 работы в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ, 2 работы, входящие в международную реферативную базу данных Scopus, 1 заявка на патент. Полученные результаты доложены в разные годы на более чем десяти Международных и Всероссийских конференциях.

Структура и содержание диссертационной работы. Диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста. Работа включает 47 рисунков и 8 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, полученных результатов и обсуждений, выводов и списка использованных источников. Библиография включает 192 отечественных и зарубежных источника.

Во введении обоснованы актуальность исследований, степень разработанности темы, научная новизна, практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов. Приводится соответствие диссертации паспорту научной специальности ВАК 1.5.6. Биотехнология, указывается личный вклад автора в выполнение работы, публикации по материалам диссертации. В конце описывается структура и объем диссертации.

В первой главе «Обзор литературы» соискатель В.А. Базулева дает характеристику развития белкового производства в России, рассматривает современные растительные источники белковых веществ, их химический состав и биологическое значение, показывает насколько разнообразным может быть переработка бобовых культур и применение белковых веществ.

Соискатель, пользуясь источниками литературы зарубежных и отечественных авторов, дает оценку актуальности использования бобового сырья в качестве возобновляемого источника белковых веществ и проводит сравнительный анализ состава различных бобовых культур. Автор выделяет фасоль как источник белковых

веществ, обладающих ингибиторной активностью, и приводит основные преимущества такого решения.

В источниках литературы, используемых соискателем, показано, что существует много способов для переработки растительного сырья и получения белковых веществ. Практически все они базируются на экстракции, а затем разделении крахмала и белкового раствора. Для экстракции эффективным методом является ультразвук, который позволяет разрушать клеточные оболочки, ускорять процесс выделения и воздействовать на антиалиментарные факторы фасоли. Благодаря своей биологической активности белки фасоли могут применяться в качестве консерванта фуражного зерна. Автором приводятся химические и биологические методы хранения зерновых культур, их преимущества и недостатки по сравнению друг с другом. Применение ингибиторов для подавления жизнедеятельности нежелательных микроорганизмов рассматривается как наиболее выгодная стратегия в направлении сохранения зерновых культур.

Таким образом, автор с разных сторон подошел к авторским и обзорным источникам для составления литературного обзора по теме диссертации, адекватно сопоставляет данные между собой, что свидетельствует о высоком квалификационном уровне.

Во второй главе «Объекты и методы исследования» обоснован выбор источника для получения белково-фосфатного комплекса, дана адекватная оценка материалов и методов, применяемых для такого рода исследований. Достаточно подробно описываются методы извлечения белковых веществ, определения амилолитической активности, физико-химические методы. Заслуживают внимания исследования по определению всхожести семян, поскольку являются трудоемкими и времязатратными.

Широкий спектр разноплановых методов, использованных при проведении исследования, позволяет сделать вывод, что работа выполнена на высоком методологическом уровне, а соискатель является высококвалифицированным специалистом.

В третьей главе соискатель описывает результаты, касающиеся получения белково-фосфатного комплекса из красной фасоли сорта Кидни, исследования его химического состава и биологической активности по отношению к различным амилазам. Для извлечения белковых веществ из фасоли использовали измельчение сырья, затем экстракцию. Автором показано сравнение различных реагентов, позволяющих проводить экстракцию и эффективность именно фосфатных буферов. По ходу анализа выявлено, что большее количество белков (263 ± 2 мг/г) было получено при использовании фосфатного буфера с рН 8. Автором также было подобрано оптимальное количество буфера для увеличения выхода целевого продукта. Для ускорения процесса извлечение белковых компонентов осуществлялась экстракция в ультразвуковом поле с применением ультразвуковой ванны. Оптимальное время экстракции соответствовало 10 минутам, что приводило к увеличению количества полученного вещества и повышению температуры, не позволяющей разрушать структуру белковой молекулы. Автор отмечает, что ультразвук также влияет на крахмальную фракцию, вызывая деструкцию крахмала и

уменьшение размеров молекул, что в свою очередь влияет на повышение растворимости и прозрачности. После ультразвуковой экстракции проводилось центрифугирование для отделения крахмала от белков: проведение процесса при низкой температуре способствовало лучшему сохранению биологической функции белков. Выбор осадителя для белков вызывает актуальный интерес поскольку осадитель не должен быть токсичным, не должен нарушать структуру белковых молекул и влияет на ингибиторную активность. Была проведена сравнительная характеристика органических веществ и выбран ацетон в соотношении к белковому раствору 2:1. Далее исследователь проводил обработку диэтиловым эфиром для удаления липидов и фенольных соединений. Конечный продукт высушивали. Таким образом, была описана методика получения белково-фосфатного комплекса в лабораторных условиях, все стадии подробно описаны и результаты обоснованы.

В следующих пунктах соискатель проводит исследование по влиянию белково-фосфатного комплекса на амилазы *Aspergillus oryzae* и панкреатическую. Из исследований видно, что белково-фосфатный комплекс из красной фасоли наиболее активный на 10 минутах реакции с крахмалом и амилазами, одинаково активен в отношении всех рассмотренных амилаз.

Также описывается состав белково-фосфатного комплекса с помощью различных физико-химических методов. Соискатель подчеркивает, что по разработанной методике можно добиться продукта без крахмала и липидов. Также описывается аминокислотный состав, что демонстрирует высокую ценность полученного белоксодержащего продукта, значительное количество принадлежит аргинину $1,73 \pm 0,69\%$, а также лизину $1,63 \pm 0,55\%$. Доказательством содержания фосфатов могут служить поставленные опыты, высокая зольность ($38,4 \pm 0,02\%$), термогравиметрический и спектральный анализ. Соискателем проведено сравнение размеров белковых частиц при ультразвуковой обработке и без нее. Ультразвук позволяет получать частицы с меньшим диаметром (от 380 до 620 нм) и высокой ингибиторной активностью. В ходе термогравиметрического анализа также наблюдались небольшие различия между образцами, полученными экстракцией ультразвуком и без ультразвука. Изучение ИК-спектров позволило определить группировки и связи, образующие структуру белково-фосфатного комплекса. Автор указывает на то, что ультразвук позволяет отщепляться молекулам на концах аминокислот.

В следующем разделе соискатель описывал эффективность белково-фосфатный комплекс по отношению к амилазам ржи сорта «Дымка» при проращивании, то есть, возможно ли использовать полученный белково-фосфатный комплекс для ингибирования биологических процессов зерна. В результате было выяснено, что комплекс оказывает подавляющее воздействие на микроорганизмы, находящиеся на поверхности зерна и на амилазы зерна. В результате был выбран полусухой способ обработки семян при концентрации белково-фосфатного комплекса 10%.

Результаты изложены подробно в виде выводов и описывают:

- способ получения белково-фосфатного комплекса из семян фасоли, обладающего ингибиторной активностью по отношению к α -амилазам;

- влияние ультразвуковой экстракции на размеры частиц белково-фосфатного комплекса,

- состав белково-фосфатного комплекса (39,2% сырого протеина, фосфатов 21,97%, зольность 38,4 %, влажность 5%) основываясь на физико-химических методах исследования (инфракрасная спектроскопия, термогравиметрический анализ);

- ингибиторная активность белково-фосфатного комплекса по отношению к α-амилазе *Aspergillus oryzae*, панкреатической амилазе, амилазе зерновых культур. Активность амилазы *Aspergillus oryzae* снижается с 305 ед/г до 200 ед/г на 10 минуте реакции. Наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора концентраций 0,000001% и 0,00001%.

- подавление развития грибов зерна родов *Alternaria*, *Aspergillus* и семейства *Zygomycota*; методом протравливания можно ингибировать процессы прорастания в зерне, при концентрациях препарата 10% и 13% наблюдается наиболее оптимальных эффект подавления прорастания злаковых семян.

- использование крахмалсодержащего жмыха для сбраживания.

Актуальность, новизна исследований, большой объем выполненных экспериментов и квалифицированное обсуждение результатов с привлечением оригинальных источников позволяют положительно оценить данную научную работу.

В качестве вопросов и замечаний по диссертации можно отметить следующее:

1. Соискателю следовало бы в заключении указать направление дальнейших исследований, поскольку необходимо показать, можно ли защитить и другие культуры от прорастания и грибов.
2. Есть ли дефицит данных ингибиторов на рынке? Какой экономический эффект от использования белково-фосфатного комплекса?
3. Почему в качестве источника белково-фосфатного комплекса была выбрана красная фасоль сорта Кидни?

Иногда по тексту диссертации встречаются стилистические неточности и опечатки. Тем не менее, приведенные замечания не снижают общего положительного впечатления от работы, вопросы и замечания носят дискуссионный характер.

Соответствие диссертации критериям положения о присуждении ученых степеней.

Диссертационная работа Базулевой Виктории Александровны на тему: «Свойства и практическое применение белково-фосфатного комплекса, полученного из *Phaseolus vulgaris* (*Kidney bean*)» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по разработке способа получения белково-фосфатного комплекса из бобового сырья и дальнейшего использования его в качестве консерванта фуражного зерна, имеющей важное значение для развития биотехнологии и сельского хозяйства, и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки) по направлениям исследований в 7 (в части технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии), 25 (технологии биологически активных соединений и биопрепаратов).

Автореферат и публикации соответствуют содержанию диссертационной работы.

Диссертация Базулевой Виктории Александровны на тему: «Свойства и практическое применение белково-фосфатного комплекса, полученного из *Phaseolus vulgaris* (Kidney bean)» соответствует необходимым критериям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, соответствует пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в ред. От 25.01.2024), а ее автор Базулева Виктория Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология.

Официальный оппонент:

кандидат технических наук (05.18.07 – биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ), доцент кафедры биотехнологии и биоорганического синтеза Института прикладной биотехнологии и пищевой инженерии имени академика РАН И.А. Рогова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)».

25 ноября 2024 г

Фоменко Иван Андреевич

Тел. +7(906)036-06-05

e-mail: fomenkoia@mgupp.ru

Федеральное государственное бюджетное образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11. Тел. +7 (499) 750-01-11, e-mail: mgupp@mgupp.ru, web-site: <https://www.mgupp.ru/>

Подпись Фоменко И.А. удостоверяю:

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»,
член-корреспондент РАО

Ефремова Галина Ивановна

