

В диссертационный совет Д 006.021.02
при ФГБНУ «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, доцента Неминущей Ларисы Анатольевны на диссертационную работу Афанасьева Дмитрия Алексеевича на тему: «Разработка технологии ферментированных колбас, обогащенных биологически активными пептидами», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальностям 05.18.04 – «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств» и 05.18.07 – «Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ»

Актуальность темы выполненной работы

В последние десятилетия ведутся интенсивные исследования по получению биологически активных веществ белковой и пептидной природы. Перспективным природным источником таких соединений является высокобелковое сельскохозяйственное сырье, в т.ч. ферментированные мясные продукты. Говоря о путях формирования и высвобождения функциональных соединений с биологической активностью, следует отметить ферментацию мясного сырья стартовыми культурами бактерий, активно применяющимися в мясной промышленности с целью улучшения органолептических и функциональных характеристик готового продукта.

Ввиду того, что стартовые культуры, как правило, проявляют протеолитическую активность, способствующую биохимическим превращениям белков мышечной ткани, актуальным становится вопрос о разработке теоретических подходов и алгоритма отбора стартовых культур на основе предварительного исследования их протеолитического потенциала, направленного на образование коротких пептидов, обладающих различными биологически активными свойствами.

Таким образом, диссертационная работа Дмитрия Алексеевича Афанасьева, направленная на разработку обогащенных биологически активными пептидами сырокопченых колбас посредством применения направленно отобранных стартовых культур с высоким протеолитическим

потенциалом и разработкой на их основе бактериального препарата, является актуальной и востребованной.

Научная новизна работы

Осуществлен направленный скрининг протеолитических стартовых культур, основанный на определении наличия генов протеолитической активности в геноме микроорганизмов, протеолитической активности их внутриклеточных экстрактов, а также стандартного качественного протеолитического теста.

Теоретически показано и экспериментально установлено специфическое протеолитическое воздействие исследуемых стартовых культур на белки ферментируемой мышечной ткани *I. dorsi* КРС.

Разработан отечественный бактериальный препарат «ФермБиакт» на основе стартовых культур, оказывающих наиболее выраженный протеолитический эффект на белки мышечной ткани. Осуществлена опытно-промышленная выработка образцов сыропотченых колбас с использованием нового препарата и импортной бактериальной композиции Bactoferm SM 194, проведено их сравнение с последующей оценкой белкового профиля.

Спрогнозирована потенциальная биологическая активность для пептидов, полученных из образцов ферментированной стартовыми культурами мышечной ткани и из сыропотченой колбасы с разработанным бактериальным препаратом.

Практическая значимость полученных результатов

Проведенные исследования имеют практическое значение для пищевой, в т.ч. мясной отрасли. В результате проведенных исследований предложена схема направленного отбора стартовых культур, способствующих образованию биологически активных пептидов в ходе ферментации мышечной ткани, разработан бактериальный препарат «ФермБиакт» и проект нормативной и технической документацией на него (ТУ и ТИ) – «Препарат бактериальный сухой «ФермБиакт» для производства ферментированных мясных изделий», получен патент № RU 2753890 С1 «Препарат бактериальный протеолитический для производства ферментированных мясных изделий» и опубликовано учебное пособие «Биологически активные пептиды: роль ферментолиза в их образовании» для студентов направления подготовки «Биотехнология».

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Научные положения, выводы и рекомендации, приведенные в диссертационной работе, теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены результатами собственных исследований.

Тема диссертационной работы полностью раскрыта в содержании рукописи. Поставленная в результате проведенных исследований цель достигнута, выводы обоснованы и согласуются с поставленными задачами, полностью отражая проведенные исследования.

Научная работа выполнена диссидентом самостоятельно, на хорошем методическом уровне с использованием современных аналитических методов исследования и биоинформационного анализа.

Основные результаты и положения работы отражены в научных публикациях, а также обсуждены на научно-практических конференциях национального и международного уровней.

Всего по теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них – 5 публикаций в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 3 публикации в изданиях, индексируемых международными базами данных Web of Science и Scopus.

Оценка объема, структуры и содержания работы

На оппонирование представлена диссертационная работа, изложенная на 144 страницах, включающая 8 таблиц, 19 рисунков и 9 приложений. Работа имеет классическую структуру, соответствует требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011. «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления» и состоит из введения, обзора научно-технической литературы, методологической и экспериментальной частей, заключения. Библиографический список включает 173 литературных источника.

Во введении диссидентом обоснована актуальность предлагаемой к защите диссертационной работы, ее научная новизна и практическая значимость.

В первой главе представлен аналитический обзор научно-технической литературы о стартовых культурах, применяемых в мясной промышленности, о их протеолитических свойствах, молекулярно-генетических детерминантах и способности к образованию биологически активных пептидов в мясном сырье, а также о протеомных методах исследования ферментированной мышечной ткани и способах биоинформационного анализа белковых молекул.

Вторая глава посвящена методическим вопросам организации экспериментальных исследований, описанию объектов и методов, использованных в диссертационной работе, в т.ч. современных методов протеомики, микробиологии, биохимии и биоинформатики.

Третья глава рассматривает результаты исследований по оценке протеолитического потенциала исследуемых стартовых культур на основе определения наличия генов семейства PrtP и измерения протеолитической

активности внутриклеточных экстрактов. По совокупности наличия генов протеолитической активности у исследуемых штаммов и протеолитической активности их лизатов отобраны штаммы родов *Lactobacillus* и *Pediococcus*, с применением которых осуществлена ферментация мышечной ткани *l. dorsi* КРС. Проведена микробиологическая оценка ферментированных образцов, подтверждающая развитие в них внесенных стартовых культур, а также протеомное исследование методом одномерного и двумерного электрофореза, подтверждающее деструктивные изменения тяжелой цепи миозина, десмина, эластина, α -актина, тропонина Т, легкой цепи миозина 1/3, а также ряда тканевых ферментов. Масс-спектрометрическое исследование коротких пептидов показало наличие двух пептидов, представляющих интерес в отношении проявления биологической активности.

На основе наиболее эффективных в отношении протеолиза стартовых культур – *P. acidilactici*38, *L. curvatus*1, а также денитрифицирующего штамма *S. carnosus* 108 – разработан бактериальный препарат, с применением которого проведена опытно-промышленная выработка образцов сыропочченых колбас. Для образцов осуществлена физико-химическая, микробиологическая, гистологическая и органолептическая оценка, а также протеомный анализ. По результатам протеомного исследования эффект воздействия разработанного бактериального препарата был выражен при образовании N- и C-концевых фрагментов тяжелых и легких цепей миозина, а также на интенсивной деструкции тканевых ферментов. Масс-спектрометрическое исследование коротких пептидов показало наличие в образце одного пептида, потенциально обладающего биологической активностью.

Для полученных из ферментированной мышечной ткани и ферментированного мясного продукта пептидов осуществлен биоинформационный анализ, позволяющий спрогнозировать наличие у них биологической активности. Так, для пептидов SDEEVENVEEEYEEEE и TKQEYDEAGPSIVHRK, полученных экстракцией из ферментированной мышечной ткани, спрогнозирована противоопухолевая активность, а для пептида NAWGKVEADVAGHGQ, экстрагированного из образца сыропочченой колбасы – противоопухолевая и антимикробная активность.

Разработана схема направленного отбора протеолитических стартовых культур, которые способствуют наибольшим изменениям белков мышечной ткани, а также формированию биологически активных пептидов.

Оценена эффективность применения бактериального препарата по отношению к применяемым импортным бактериальным препаратам.

По нашему мнению, к несомненным достоинствам работы следует отнести следующее:

- разработка диссидентом алгоритма направленного отбора протеолитических стартовых культур и их ассоциаций, способствующих наибольшим изменениям белков мышечной ткани и формированию биологически активных пептидов;
- реализация данного алгоритма позволяет создавать новые отечественные препараты на основе стартовых культур, которые характеризуются высокой активностью и стабильностью свойств, обеспечивая тем самым производство конечных продуктов высокого качества и минимизацию связанных с ним рисков для безопасности и качества;
- применение для достижения поставленной цели современной методологии, основанной на принципах и методах биоинформационного анализа *insilico*, молекулярно-генетических и протеомных методов исследований;
- использование для статистической обработки экспериментальных результатов программного обеспечения «SPSS Statistics 23.0», поскольку программы такого типа работают по принципу «от первичной цифры – до конечного статистического вывода», что затрудняет вмешательство исследователя в промежуточный процесс статобработки с целью «нужной корректировки» результатов;
- с точки зрения системной иллюстрации представленной работы интересны рисунки 1 и 11 автореферата («Схема проведения эксперимента» и «Схема направленного отбора стартовых культур, образующих БАП в мясном сырье и готовых мясных продуктах» соответственно), поскольку наглядно отображают: 1) логику эксперимента, реализованного для решения поставленной задачи, и 2) полученный в результате алгоритм создания препарата на основе стартовых культур.

В процессе рецензирования работы Д.А. Афанасьева возникли некоторые вопросы и замечания:

1. В разделе 3.1 диссертации представлены результаты измерения внутриклеточной протеолитической активности лизатов исследуемых микроорганизмов. По тексту диссертации ясно, что молочнокислые бактерии обладают широким спектром протеиназ и эндо- и экзопептидаз. Почему не была исследована внеклеточная протеолитическая активность микроорганизмов, и можно ли считать определение разжижения желатина внеклеточной активностью?

2. Результаты исследования спектра коротких пептидов в образцах ферментированной мышечной ткани (раздел 3.3 диссертации) указано, что «Наибольшую способность формировать широкий спектр пептидов показала культура *L. sakei* 105», однако, при составлении бактериального препарата «ФермБиакт» (раздел 3.4 диссертации) данная культура не используется. Просьба автору пояснить.

3. Оценка таких физико-химических показателей как водородный показатель pH и активность воды a_w для сыропочченых колбас была осуществлена на 10 сутки после сушки батонов. Известно, что микробиологические и биохимические показатели могут изменяться на протяжении всего срока годности продукта. Исходя из этого, было бы правильнее оценить вышеуказанные показатели в нескольких точках в пределах срока годности.

4. Считаем, что также нужно было оценить содержание идентифицированного пептида в сыропочченой колбасе, выработанной с разработанным бактериальным препаратом, в нескольких точках, т.к. данный пептид мог быть разрушен в результате продолжающихся микробиологических и биохимических процессов.

5. В тексте диссертации и автореферата отмечены некоторые оформительские, грамматические, синтаксические и стилистические неточности – что неизбежно при таком объеме текста.

Следует отметить, что имеющиеся замечания не носят принципиального характера и не снижают значимости полученных автором результатов.

Заключение по диссертации

Таким образом, оппонируемая диссертация является научно-квалификационной работой, в которой изложена четкая последовательность стадий при отборе наиболее перспективных стартовых культур, способствующих образованию биологически активных пептидов, которые можно применять при производстве функциональных сыропочченых колбасных изделий.

Диссертация Д.А.Афанасьева «Разработка технологии ферментированных колбас, обогащенных биологически активными пептидами» по актуальности, научной новизне, полученным результатам, достоверности и обоснованности выводов является завершенной научно-исследовательской работой. Представленная работа соответствует паспорту научных специальностей 05.18.04 – «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств» и 05.18.07 – «Биотехнология

пищевых продуктов и биологических активных веществ», требованиям п.п. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук, а ее автор Дмитрий Алексеевич Афанасьев заслуживает присуждения искомой степени по специальностям 05.18.04 – «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств» и 05.18.07 – «Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ».

Ведущий научный сотрудник отдела
обеспечения качества лекарственных
средств для ветеринарии и
животноводства ФГБНУ «Всероссийский
научно-исследовательский и
технологический институт
биологической промышленности»,
доктор биологических наук по научной
специальности 03.01.06 –
«Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии)», доцент

Лариса Анатольевна
Неминущая

Личную подпись Ларисы Анатольевны
Неминущей удостоверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «ВНИТИБП»,
кандидат сельскохозяйственных
наук

Е.В. Маркова



«18» июля 2022 г.

141142, Московская обл., городской округ Лосино-Петровский, поселок
Биокомбината, строение № 17, корпус 1
Тел/ Факс 8 (49656)7-32-63 e-mail: vnitibp@mail.ru