

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 технических наук, профессора Тихонова Сергея Леонидовича на диссертационную работу Афанасьева Дмитрия Алексеевича на тему: «Разработка технологии ферментированных колбас, обогащенных биологически активными пептидами», представленной на соискание ученой степени кандидата 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

Ферментированные мясные продукты традиционно изготавливаются с применением стартовых культур, среди которых важное значение имеют молочнокислые микроорганизмы, посредством эндо- и экзопептидаз которых осуществляется протеолиз саркоплазматических и миофибриллярных белков мышечной ткани.

Традиционные ферментированные продукты, в которых присутствуют молочнокислые микроорганизмы, характеризуются наличием различных пептидных последовательностей. Среди этих пептидов выделяют рибосомально продуцируемые бактериоцины и побочные продукты протеолиза белков – биологически активные пептиды. Отмечено, что образование биологически активных пептидов в мясном сырье зависит от ферментативной активности, и факторы, влияющие на их продукцию, специфичны для штамма. Разнообразие протеиназ молочнокислых микроорганизмов обусловливает широкий спектр образующихся биологически активных пептидов с различными свойствами, даже при использовании одного и того же субстрата.

В связи с этим, необходимым является изучение путей образования биологически активных пептидов в процессе ферментации мышечной ткани направленно отобранными стартовыми культурами с высоким протеолитическим потенциалом.

Таким образом, диссертационная работа Афанасьева Д.А. направленная на разработку технологии сырокопченых колбас, обогащенных биологически активными пептидами, посредством применения предварительно отобранных протеолитических стартовых культур, является своеевременной и актуальной.

Научная новизна работы

Научная новизна исследования заключается в том, что:

- осуществлен направленный скрининг протеолитических стартовых культур;
- описано специфическое протеолитическое воздействие исследуемых стартовых культур на белки ферментируемой мышечной ткани *L. dorsi* КРС;
- разработан бактериальный препарат «ФермБиакт» на основе стартовых культур, оказывающих наиболее выраженный протеолитический эффект на белки мышечной ткани, и осуществлена опытно-промышленная выработка образцов сыроподобных колбас с последующим протеомным анализом, физико-химической, микробиологической, гистологической и органолептической оценкой;
- с применением биоинформационных баз данных спрогнозирована потенциальная биологическая активность для пептидов, экстрагированных из образцов ферментированной мышечной ткани и из образца сыроподобной колбасы с разработанным бактериальным препаратом.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Теоретическая значимость работы подтверждена опубликованным учебным пособием «Биологически активные пептиды: роль ферментолиза в их образовании» для студентов направлений подготовки бакалавров 19.03.01 – Биотехнология и магистров 19.04.01 – Биотехнология.

Практическая значимость работы подтверждена патентом «Препарат бактериальный протеолитический для производства ферментированных мясных изделий», а также проектом нормативной и технической документации (ТУ и ТИ) – «Препарат бактериальный сухой «ФермБиакт» для производства ферментированных мясных изделий».

Совокупность представленных диссертационных исследований представляет научный и практический интерес с точки зрения разработки новой технологии сыроподобных колбас с использованием стартовых культур, способствующих обогащению ферментированного мясного продукта биологически активными пептидами.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Достоверность результатов исследования достигается автором за счет использования в качестве теоретической и методологической основы диссертации базовых исследований и прикладных научных трудов отечественных и зарубежных ученых в области микробиологии, науки о технологиях ферментированных мясных продуктов и протеомных методов исследования; применением методов сбора и обработки информации. Представленные в работе таблицы, рисунки, используемые экспериментальные методы и обработка получаемых данных свидетельствует о том, что результаты достоверны и достаточны для проведения их обобщения и анализа.

Оценка объема, структуры и содержания работы

Анализ содержания диссертации показывает, что работа включает все необходимые компоненты научного исследования: обзор научно-технической литературы, формулировку цели и задач исследования, методологию организации работы, изложение результатов исследование и их обсуждение, заключение по результатам работы.

Работа изложена на 144 страницах, включает 8 таблиц, 19 рисунков и 9 приложений. Библиографический список включает 173 зарубежных и отечественных источника литературных данных.

Во **введении** диссертантом обоснована актуальность работы, цель, научная новизна и практическая значимость. При анализе и оценке отдельных разделов диссертации, можно отметить, что материал изложен последовательно, логично и в достаточной степени проиллюстрирован.

В **первой главе** представлен аналитический обзор научно-технической литературы по основным вопросам диссертационной работы. Обзор научно-технической литературы систематизирован и характеризует материал, непосредственно касающийся темы диссертации. Приведенные в обзоре материалы подтверждают достаточное владение автором рассматриваемых вопросов.

В **второй главе** диссертационной работы дана подробная схема организации эксперимента, отражающая последовательность проведения экспериментов и теоретических обобщений различных этапов работы. Также, представлены объекты и приведены описания применяемых в ходе исследования методов со ссылками на источники информации.

В **третьей главе**, состоящей из 8 подразделов, рассмотрены результаты исследований протеолитической активности исследуемых стартовых культур на основании обнаружения генов протеолитической активности семейства PrtP и измерения протеолитическая активность внутриклеточных экстрактов. Отобраны наиболее протеолитические штаммы родов *Lactobacillus* и *Pediococcus* по совокупности наличия генов протеолитической активности и протеолитической активности внутриклеточных экстрактов. Осуществлена ферментация мышечной ткани *l. dorsi* КРС отобранными культурами с последующей микробиологической и протеомной оценкой образцов. Протеомное исследование свидетельствовало о деструкции основных мышечных белков и тканевых ферментов, что приводило к образованию широкого спектра фрагментов по сравнению с контрольным образцом. Наиболее выраженный эффект оказывала культура *L. sakei* 105. При оценке наличия коротких пептидов в образцах ферментированной мышечной ткани обнаружены два пептида. Отмечено, что один из пептидов – TKQEYDEAGPSIVHRK – формировался в мышечной ткани под действием ферментных систем 3-х из 4-х исследуемых стартовых культур. При последующем биоинформационном прогнозировании биологической активности выявлено, что идентифицированные пептиды потенциально обладают противоопухолевой активностью.

С разработанным на основании предварительного исследования протеолитического потенциала стартовых культур бактериальным препаратом «ФермБиакт» осуществлена ферментация мышечной ткани в процессе опытно-промышленной выработки сыропочченых колбас. Для оценки эффективности разработанного бактериального препарата проведена аналогичная выработка сыропочченых колбас с применением импортного бактериального препарата Bactoferm SM 194 компании Christian Hansen. Осуществлена оценка протеомных изменений в образцах сыропочченых колбас, согласно которой отмечены деструктивные изменения тканевых ферментов, а также образование N- и C-концевых фрагментов тяжелых и легких цепей миозина. Из образца сыропочченой колбасы, выработанного с применением разработанного бактериального препарата экстрагирован один пептид, обладающим потенциальной противоопухолевой и антимикробной активностями, о чем свидетельствовали результаты биоинформационного анализа. Физико-химическая, микробиологическая, гистологическая и органолептическая оценка образцов сыропочченых колбас подтвердила их соответствие данному виду продукции. Оценена эффективность применения разработанного бактериального препарата в условиях импортозамещения.

По результатам исследования разработана и предложена схема направленного отбора протеолитических стартовых культур, способствующих образованию биологически активных пептидов в ферментированном мясном сырье и ферментированному мясному продукте.

Раздел «ВЫВОДЫ» содержит 8 пунктов, которые характеризуют конечные результаты представленной работы.

В разделе «ПРИЛОЖЕНИЯ» представлена уточняющая информация об объектах исследования, акт об опытно-промышленной выработке сыропочченых колбас, а также патент, проект технических условий и технологической инструкции на бактериальный препарат.

Автореферат изложен на 28 страницах, включает 8 таблиц, 11 рисунков и содержит сведения о 18 печатных работах, 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, а также один патент на бактериальный препарат и 1 учебное пособие для студентов. Материалы, представленные в автореферате, в полной мере соответствуют материалам, изложенным в диссертационной работе. Опубликованные автором научные труды достаточно полно отражают содержание диссертационного исследования.

Работа является законченной и выполнена автором на достаточном уровне. Диссертационное исследование соответствует пунктам 1, 4, 6, 7 паспорта специальности 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств, а также пунктам 1, 3, 6, 11 паспорта специальности 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ.

Вопросы и замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы

При общей положительной оценке диссертационной работы имеются следующие замечания:

1. В рецептуру сырокопченых колбас помимо животного сырья входит и соя – высокобелковое растительное сырье. Может ли соя являться источником биологически активных пептидов?

2. В диссертации в разделе «Материалы и методы» (п. 2.3.6) указано, что «Инкубация образцов осуществлялась на протяжении 12 сут при температуре $+10\pm2$ °С в условиях вакуума». Однако не ясно, чем обоснован выбор срока и условий ферментации мышечной ткани стартовыми культурами?

3. В разделе «Результаты исследований» (п. 3.3 и п. 3.4.7) указано, что в результате протеомного анализа мышечной ткани, ферментированной стартовыми культурами, и образцов сырокопченых колбас, выработанных с применением разработанного бактериального препарата, образуются фрагменты белков и короткие пептиды. Однако, в представленных результатах не сказано о воспроизводимости в образовании данных фрагментов и пептидов при изменении условий ферментации. Будут ли внесенные культуры способствовать образованию аналогичных продуктов протеолиза при иных условиях ферментации?

4. В образцах сырокопченых колбас, ферментированных разработанным бактериальным препаратом, идентифицирован пептид и оценена его потенциальная биологическая активность. Известно, что данные соединения нестабильны и быстро подвергаются распаду. Был ли осуществлен контроль сохранения этого пептида на протяжении срока годности образцов сырокопченых колбас?

5. Был выявлен пептид с антимикробной активностью. Не повлияет ли он на жизнедеятельность стартовых культур?

Следует отметить, что имеющиеся замечания не носят принципиального характера, не снижают значимости полученных в диссертационном исследовании результатов и могут быть учтены автором при дальнейших исследованиях.

Заключение по диссертации

Диссертационная работа представляет собой целостную научно-исследовательскую работу, имеющую несомненную научную и практическую значимость для мясной отрасли.

Диссертационная 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), предъявляемых к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор

Афанасьев Д.А. 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».

Заведующий кафедрой пищевой инженерии ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», доктор технических наук по научной специальности 05.18.15 – Технология и товароведение пищевых продуктов функционального и специализированного назначения и общественного питания, профессор

Сергей Леонидович
Тихонов

Личную подпись Сергея Леонидовича Тихонова удостоверяю

Ученый секретарь ученого совета ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»

Надеина Елена
Анатольевна

«18» июля 2022 г.



620144, Екатеринбург, 8 Марта / Народной Воли, 62 / 45 ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»
Номер телефона: 8 (912) 276-98-95

Электронная почта: tihonov75@bk.ru