

### **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

**доктора технических наук, профессора кафедры биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» Ивановой Людмилы Афанасьевны на диссертационную работу Куликова Дениса Сергеевича «Комплексная биотехнологическая переработка гороховой муки с получением белковых концентратов», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ» (технические науки)**

**Актуальность темы диссертационной работы.** Интерес к белку из зернобобовых в составе различных пищевых и кормовых продуктов обусловлен его питательной ценностью, надлежащими функциональными свойствами и относительно низкой стоимостью. Белковые концентраты и изоляты из гороха, в основном импортного производства, с содержанием белка до 80 % сегодня применяют в производстве хлебобулочных, макаронных изделий, имитационного молока, творога, йогурта, мясных аналогов, детского, спортивного питания, пищевых добавок и т.д. Однако в связи с высокой потребностью в белковых продуктах важна разработка отечественных технологий концентрированных форм растительного белка с высокой биологической и функциональной ценностью. Такие формы можно получить без применения химических реагентов, в том числе щелочи, вызывающих образование новых поперечных связей с возможностью оказывать негативное воздействие на здоровье человека и животных. Сведений об использовании одних ферментных препаратов для получения высокого выхода безопасных белков с повышенной массовой долей их в препаратах и надлежащих функциональных свойствах из зернобобовых культур недостаточно. В связи с этим **биотехнологическая переработка гороховой муки с получением белковых концентратов пищевого и кормового белка с разработкой** новых технологий без использования щелочных реагентов или с минимальным их количеством с созданием эффективных технологических схем актуальна.

**Научная новизна.** Диссертантом установлены закономерности растворимости белков гороховой муки под влиянием гидролитических ферментных препаратов (Viscoferm L, Shearzym 500 L, Fungamyl 800 L, AMG 300 L 2500) в зависимости от гидромодуля, продолжительности реакции, концентрации и активностей ферментных препаратов; впервые определены константы Михаэлиса для протеолитических ферментов препаратов Alcalase 2,4 и Distizym Protacid ( $16,7 \times 10^{-7}$  моль/дм<sup>3</sup> и  $10,0 \times 10^{-7}$  моль/дм<sup>3</sup>, соответственно) и, таким образом, научно обоснован выбор применения первого препарата, по сравнению со вторым. Выявлено увеличение выхода белка (на 14,79 %) в изoeлектрической точке с совместным применением 1 %-ного лактата кальция и 4,29 ед./г СВ микробной трансглутаминазы.

Автором установлена корреляционная взаимосвязь между цветом муки, пищевых и кормовых белковых продуктов с количеством фенолокарбоновых кислот и их производных в сырье и готовых продуктах ( $r=0,897$ ). Чем выше содержание фенолокарбоновых кислот в исходной муке и концентратах, тем темнее белковый продукт, что ценно для предсказания конечного цвета продукции. Пониженная пенообразующая способность, но высокая стабильность пены белковых концентратов светлых оттенков, обусловлены большим количеством параллельных  $\alpha$ -спиралей (в 7 раз),  $\beta$ -структуры (в 2 раза) и меньшим содержанием антипараллельных  $3_{10}$ -спиралей (в 1,3-6,0 раз).

Диссертантом создана математическая модель для регулирования параметров биоконверсии (рН 6,0–6,5, температура 25–28 °С, количество посевного материала 3–4 %) вторичных продуктов переработки (нерастворимый остаток и сыворотка) гороховой муки путем их трансформации с симбиозом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 121 и гриба *Geotrichum candidum* 977 в биологически полноценные кормовые дрожжи.

#### **Практическая значимость работы:**

Методами математической обработки данных определены оптимальные параметры растворимости белков: с выявлением их оптимальных значений (температура 50-55 °С, концентрация ФП 1,0–1,5 %/г белка, гидромодуль мука:вода 1:10÷1:15, продолжительность 2–4 ч, мощность ультразвукового воздействия 150 Вт, амплитуда волны 10 мкм, продолжительность ультразвука 3 мин; дозировка лактата кальция (1 %) и транглутаминазы (4,29 ед./г СВ) с выходом до 74,79 % от содержания в сырье. Концентрат содержал 74,40–86,07 % на СВ белков с аминокислотным скором 109–212 %, минеральные вещества (железо, кальций и др.), липиды, углеводы. Перевариваемость концентрата *in vitro* выше в 1,5–1,7 раза, чем у альбумина. Активность уреазы – 0–0,01 ед., что указывало на отсутствие ингибиторов ферментов пищеварения. Белковый концентрат обладал основными функционально-технологическими свойствами, без горохового запаха и привкуса.

Определены параметры выхода дрожжей *S. cerevisiae* 121 и гриба *G. candidum* 977: температура, рН, количество посевного материала с массовой долей белка в биомассе из сыворотки 61,68±0,47 %, из сыворотки с нерастворимым остатком – 51,43±3,76 %. Установлены параметры гидролиза нерастворимого остатка и условия его совместной микробной биоконверсии с сывороткой (2–10 % нерастворимого остатка, рН 1,8–2,0, температура 110–129 °С, 25–30 мин, давление 1 атм.). При этом усваивались стахиоза, мальтоза, сахароза, арабиноза, глюкоза, фруктоза, галактоза, ксилоза. Кормовые дрожжи содержали, помимо белка, 2–8 % липидов, 8–9 % – зольность. Аминокислотный скор – 90–247 %, соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот 1:3, омега-6 жирные кислоты – 19,73 %, транс-изомеры – до 5,0 %, минеральные элементы Na, K, Ca, Mg, Zn и др. Массовая доля нуклеиновых кислот – 0,005–0,072 %, перевариваемость – 85,73–89,74 %.

На основании результатов научных исследований апробированы технологические процессы получения белкового концентрата в ООО «Биопрогресс» и культивирования штаммов дрожжей родов *S. cerevisiae* 121 и *G. candidum* 977 на вторичных продуктах переработки гороховой муки в ЦКП «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Апробировано применение кормовых дрожжей взамен соевого шрота в составе комбикормов для цыплят-бройлеров кросса «Росс 308» в ООО НВЦ «Новые

биотехнологии» и осуществлена проверка их безопасности на крысах линии «Wistar» в виварии «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Разработана нормативная документация (ТИ, ТУ на белковый концентрат и кормовые дрожжи), рецептура кисломолочного продукта с гороховым белковым концентратом с учетом функциональных свойств, содержащего минеральные элементы, в частности железо, что позволяет рекомендовать продукт для специальных целей, и рецепт комбикорма для цыплят-бройлеров с кормовыми дрожжами взамен соевого шрота. Рецепт обеспечивал увеличение в соотношении белок-жир первого компонента и привес цыплят.

#### **Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.**

Обоснованность и достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных и стандартных физико-химических, биохимических, микробиологических методов анализа, применением математических, статистических расчетов, повторностью проводимых экспериментов. Научные положения и выводы подтверждены фактическими данными, представленными в табличном и графическом материалах диссертации, проведением опытно-промышленных испытаний процессов получения белкового концентрата и кормовых дрожжей по разработанным параметрам, обсуждением результатов исследования на многочисленных конференциях и научных семинарах.

#### **Краткая характеристика основного содержания диссертации.**

Основной текст диссертации Д.С. Куликова изложен на 136 страницах машинописного текста, содержит 40 таблиц, 31 рисунок, состоит из введения, трех глав результатов исследований, заключения, списка литературы (253 источника). На 22 страницах 8 приложений.

**Во введении** обоснована актуальность темы, определена степень научной разработанности, сформулирована цель и задачи исследований, необходимые для реализации поставленной цели, научная новизна, практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту.

**В первой главе «Обзор литературы»** приведены результаты анализа аналитического обзора научных публикаций российских и зарубежных ученых.

Описаны современные проблемы переработки зернобобовых культур с получением пищевых и кормовых белковых продуктов. Проанализирован рынок производства зернобобовых культур. Описан состав, особенности структуры белков, пищевая, биологическая ценность, функциональные свойства белковых продуктов из гороха и сферы их применения. Выполнен анализ технологий производства растительных белковых продуктов, их преимущества и недостатки. Рассмотрен процесс микробиологической трансформации вторичных продуктов переработки растительного сырья в пищевые и кормовые белковые продукты. Сформулированы краткие выводы по литературному обзору.

**Во второй главе «Объекты и методы исследований»** приведено описание используемых в работе сырья, материалов и методов исследований.

Объектами исследований явились сортовая гороховая мука; товарная нативная и экструдированная гороховая мука; сортовая нутовая нативная и экструдированная мука; коммерческие гороховые изоляты; ферментные препараты с ксиланазной, целлюлолитической, амилазной, глюкоамилазной и протеолитической активностями. Для

осаждения белков – трехзамещенный цитрат кальция, лактат кальция, трансклотаминаза. Для биоконверсии вторичных продуктов переработки гороховой муки – дрожжи *S. cerevisiae* 121 и микромицет *G. candidum* 977 из коллекции Института микробиологии им. С.М. Виноградского. Для экспериментальных исследований использовались стандартные (массовая общего белка – по методу Кьельдаля (Nх6,25), истинного белка – по методам Барнштейна, Лоури; крахмала – по методу Эверса; углеводного и аминокислотного составов хроматографическими методами; молекулярных масс белков методом гелеэлектрофореза в SDS-ПААГ; активность уреазы белковых концентратов; макро- и микроэлементов методом пламенной абсорбции после сухого озоления образцов на спектрофотометре; перевариваемость и жирнокислотный состав кормовых дрожжей; общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, бактерий группы кишечной палочки, патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл, дрожжей и плесневых грибов) и специальные (фракционный состав белков муки; ультразвуковая обработка; расчет аминокислотного сора; перевариваемость белковых концентратов по методу А.А. Покровского и И.Д. Ертанова; вторичная структура белков методом кругового дихроизма; содержание фенолокарбоновых кислот и их производных по методу М.В. Гаврилина; методика проведения гидролиза белковых концентратов; выращивание биомассы на вторичных продуктах переработки муки; массовая доля нуклеиновых кислот в дрожжах по методу Спирина; методика приготовления кисломолочного напитка; методики кормления крыс и цыплят-бройлеров; статистическая обработка данных) методы исследования с математической обработкой данных.

В третьей главе «Результаты и их обсуждение» диссертантом подробно изложены результаты экспериментальных исследований. Обосновано использование нативной гороховой муки, что благоприятно для получения белкового концентрата без применения щелочи. Доказана возможность постадийного перевода белков в водный раствор с карбогидразами, протеазами и ультразвуковым воздействием. Совместное использование лактата кальция и микробной трансклотаминазы повышало выход белков в изoeлектрической точке до 71,86–84,44 %. Концентрат содержал 74,40–86,07 % на СВ белков с аминокислотным скором 109–212 %. Перевариваемость концентрата *in vitro* выше в 1,5–1,7 раза, чем у альбумина. Активность уреазы – 0–0,01 ед рН. Белковый концентрат обладал основными функционально-технологическими свойствами, без горохового запаха и привкуса. Выявлена корреляционная взаимосвязь функционально-технологических свойств с элементами вторичной структуры белков, количеством фенолокарбоновых кислот и их производных и цветом концентратов. По оптической плотности ( $D_{560}$ ) водных растворов муки и содержанию в ней фенолокарбоновых кислот рекомендуется предопределять цвет концентрата и их некоторые функционально-технологические свойства ( $r = 0,897$ ).

Разработан процесс биоконверсии сыворотки и нерастворимого крахмал-белкового остатка в кормовые дрожжи с ассоциацией культур *S. cerevisiae* и *G. candidum* 977. Создана математическая модель зависимости роста биомассы на сыворотке от технологических факторов с усвоением глюкозы, ксилозы, арабинозы, галактозы, фруктозы и определены его оптимальные параметры (рН 6,0–6,5, температура 25–28 °С, количество посевного материала 3–4 %). Установлены параметры гидролиза нерастворимого остатка и условия его совместной микробной биоконверсии с

сывороткой. Кормовые дрожжи содержали 51,09–61,68 % белка, 2–8 % липидов, 8–9 % – зольность. Аминокислотный скор – 90–247 %, соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот 1:3, омега-6 жирные кислоты – 19,73 %, транс-изомеры – до 5,0 %, минеральные элементы Na, K, Ca, Mg, Zn и др. Массовая доля нуклеиновых кислот – 0,005–0,072 %, перевариваемость – 85,73–89,74 %.

Разработан способ приготовления кисломолочного напитка с гороховым белковым концентратом и создан рецепт комбикорма с кормовыми дрожжами из вторичных продуктов переработки гороховой муки для цыплят-бройлеров, оказывающего положительное влияние на органы пищеварения.

Разработана нормативная документация: ТИ 00334735-129-2022 «Технологическая инструкция по производству концентрата белкового горохового пищевого и дрожжей кормовых из зернобобового сырья», ТУ 10.89.19-166-00334735-2022 «Концентрат белковый гороховый пищевой», ТУ 10.91.10-167-00334735-2022 «Дрожжи кормовые из зернобобового сырья». Произведен расчет производства 1 т БК и 1,25 т КД из гороховой муки. Себестоимость концентрата – 850 руб/кг, дрожжей – 58,3 руб/кг, чистая прибыль – 211,73 тыс. руб, рентабельность – 22,94 %, окупаемость производства – 6,1 месяцев.

**В заключении** представлены основные выводы по диссертационной работе.

Содержание диссертационной работы соответствует пунктам 1, 5, 6, 8, 10, 15, 16, 21, 25, 26, 29, 30 Паспорта специальности 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ».

**Оценка языка, стиля диссертации и автореферата.** Оформление работы выполнено аккуратно и иллюстрировано. Язык и стиль диссертации соответствует нормам, принятым в научно-технической литературе. Основные результаты диссертации опубликованы в 31 научной работе, в том числе – 9 в журналах, рекомендуемых ВАК, 11 – в изданиях, индексируемых международными базами данных Web of Science и Scopus, 11 – в прочих изданиях, сборниках материалов российских и зарубежных конференций. Содержание публикаций и автореферат отражают основные положения диссертационной работы. Автором в соавторстве получен патент «Способ получения кормового концентрата» RU № 2791226 от 06.03.2023 г. Диссертационная работа и автореферат диссертационной работы Куликова Д. С. оформлены в соответствии с требованиями, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям.

#### **Замечания по диссертационной работе:**

1. В литературном обзоре отсутствуют сравнительные аминокраммы белков бобовых культур и кормовых микробных белковых препаратов.

2. Дозировка микробных ферментных препаратов обычно осуществляется в единицах активности, а не в г., кг, % для возможности замены одного ферментного препарата равноценным другим препаратом.

3. Неудачное название ТУ « Дрожжи кормовые из зернобобового сырья».

4. Не указаны сроки хранения полученной продукции.

5. В тексте диссертации и автореферата отсутствуют сведения о статистической обработке полученных данных экспериментов.

Приведенные замечания и рекомендации не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы и не снижают её научную и практическую значимость.

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней.**

Диссертационная работа Куликова Дениса Сергеевича на тему «Комплексная биотехнологическая переработка гороховой муки с получением белковых концентратов» включает необходимые элементы квалификационной работы кандидатского уровня, соответствует требованиям пп. 9-14 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 18.03.2023 г.), представляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук. Считаю, что её автор Куликов Денис Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ» (технические науки).

Доктор технических наук, профессор кафедры биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»  
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11  
Рабочий тел.: +7(499)750-01-11, доб. 6883  
E-mail: biotech@mgupp.ru

Иванова  
Людмила  
Афанасьевна

«31» октября 2023 г.

Подпись профессора Л. А. Ивановой удостоверяю:

Подпись Ивановой удостоверяю  
Заместитель начальника отдела кадров  
И. В. Крюкова  
«31» 10 2023 г.

