



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке
ФХТУ им. Д.И. Менделеева
А.А. Щербина

13 » ноября 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» 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 выполненной работы

В современных условиях глобальных климатических изменений и истощения сельскохозяйственных природных ресурсов остро стоит проблема обеспечения полноценными пищевыми и кормовыми продуктами. По прогнозам экспертов, к 2050 году численность населения земли достигнет 10 млрд и производство продуктов необходимо увеличить более, чем на 60%. При этом предполагается, что в зависимости от социально-экономического развития и путей производства, возможна замена даже растительного и животного белка микробным протеином на 10–19%. В перспективе это должно привести к снижению потерь азота с пахотных земель и выбросов парниковых газов. Как микробный, так и растительный белок, может служить полноценной заменой традиционных пищевых и кормовых продуктов. Для масштабного производства биомассы микроорганизмов с целью снижения себестоимости в качестве основы питательных сред целесообразно использовать вторичные продукты глубокой переработки растительного сырья. Ферментацию с микроорганизмами-продуцентами проводят на основе твердых отходов, жидких стоков, экстрактов, сыворотки, образующихся при переработке ряда сельскохозяйственных культур. Анализ данных показывает, что

биоконверсию отходов и вторичных продуктов переработки сырья пищевой и перерабатывающей промышленности можно отнести к наиболее целесообразным и экологически обоснованным приемам их утилизации.

Особый интерес для создания технологий белковых концентратов, изолятов и переработки вторичных продуктов вызывают зернобобовые культуры: традиционная культура – горох, объемы производства которого за последние годы возрастают в среднем на 10-15 % и достигают свыше 4 млн. тонн в год. На российском рынке, к сожалению, преобладают белковые концентраты и изоляты из гороха импортного производства. Поэтому разработка наилучших доступных отечественных технологий переработки данного вида сырья, содержащего большое количество качественного белка, в пищевые и кормовые ингредиенты – проблема **актуальная**.

Отсюда целью работы явилась разработка комплексной биотехнологической переработки гороховой муки с получением безопасных биологически полноценных пищевых и кормовых белковых концентратов с заданными функциональными и органолептическими свойствами.

Новизна диссертационного исследования и полученных результатов, выводов, сформулированных автором

Научная новизна диссертационного исследования заключается в установлении закономерностей растворимости белков гороховой муки, без использования растворов щелочи, под влиянием ферментных препаратов (ФП) подкласса карбоксигидролаз ФП компании "Novozymes" (Дания): Shearzym 500 L с ксиланазной активностью 500 ед/г, Viscoferm L с целлюлолитической активностью 600 ед/г; Fungamyl 800 L – источник α -амилазы; AMG 300 L 2500 – источник глюкоамилазы; Alcalase 2,4 L FG – источник протеаз и Distizym Protacid – протеаза фирмы «Erbslon». Гидролиз белков проводили с применением ФП Protamex и Flavourzyme 500 MG с активностью 125 ед/г и 85 ед/г, соответственно, и протеаз, в зависимости от гидромодуля, продолжительности ферментации, концентрации ферментов. Установлена константа уравнения Михаэлиса-Ментен, показывающая сродство ферментного препарата к гороховым белкам, для препаратов Alcalase 2,4 и Distizym Protacid ($16,7 \times 10^{-7}$ моль/дм³ и $10,0 \times 10^{-7}$ моль/дм³, соответственно).

Для повышения выхода белков из ферментативного экстракта доказано совместное использование 1%-ного лактата кальция с 4,29 ед/г СВ микробной транслютаминазой на стадии осаждения в изoeлектрической точке, по сравнению с выходом в известных технологиях (74,79 %

против 60%).

Интерес представляет установленная корреляция между количеством фенолокарбоновых кислот и их производных в сырье и цветом муки, пищевых концентратов и кормовых дрожжей. Чем больше содержалось фенолокарбоновых кислот в муке и пищевых и кормовых концентратах, тем темнее цвет продуктов. Некоторые функциональные свойства белковых концентратов связаны с содержанием фенолокарбоновых кислот и элементами вторичной структуры их белков. Перевариваемость концентрата *in vitro* выше в 1,5–1,7 раза, чем альбумина. Активность уреазы – 0–0,01 ед рН. Гороховые концентраты обладали основными функционально-технологическими свойствами с отсутствием горохового запаха и привкуса.

Отработана биоконверсия вторичных продуктов переработки гороховой муки дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* 121 и грибом *Geotrichum candidum* 977 с высокой степенью утилизации глюкозы, ксилозы, арабинозы, галактозы. Создана математическая модель роста биомассы на сыворотке в зависимости от технологических факторов и определены оптимальные значения параметров (рН 6,0–6,5, температура 25–28 °С, количество посевного материала 3–4 %). Установлены параметры гидролиза нерастворимого крахмало-белкового остатка и условия его совместной микробной биоконверсии с сывороткой (2–10 % остатка, рН 1,8–2,0, температура 110–129 °С, 25–30 мин, давление 1 атм.). При данных параметрах проходил гидролиз крахмала до мальтодекстринов с увеличением количества восстанавливающих веществ в 4,7 раз и белка в 2,2 раза в растворе. Кормовые дрожжи содержали 51,09–61,68 % белка, 2–8 % липидов, 8–9 % золы. Аминокислотный скор составлял 90–247 %, соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот 1:3, омега-6 жирные кислоты – 19,73 %, минеральные элементы Na, K, Ca, Mg, Zn и др. Перевариваемость белков составляла 85,73–89,74 %.

Практическая значимость работы

Установленные закономерности выделения белков с использованием ферментных препаратов, без применения растворов щелочи, и биоконверсии вторичных продуктов без дополнительных минеральных или органических компонентов роста использованы для разработки комплексной биотехнологии пищевых белковых концентратов из гороховой муки с биоконверсией вторичных продуктов в кормовые дрожжи. Определены оптимальные параметры растворимости белков (размер частиц муки 102±8 мкм, гидромодуль мука:вода 1:10÷1:15, концентрация ФП 1,0–1,5 %/г белка,

pH 5,0–7,5, экстракция 2–4 ч, амплитуда волны 10 мкм, продолжительность ультразвука 3 мин) и их осаждения (дозировка лактата кальция – 1 %, трансглутаминазы – 4,29 ед./г СВ), что позволило повысить их выход до 74,8 % от содержания в сырье. Получены регрессионные уравнения зависимости выхода дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 121 и гриба *Geotrichum candidum* 977 при культивировании на вторичных продуктах переработки муки (сыворожка, нерастворимый крахмалобелковый остаток) и определены оптимальные параметры получения биомассы дрожжей (гидролиз нерастворимого остатка и условия его совместной микробной биоконверсии с сывороткой (2–10 % остатка, pH 1,8–2,0, температура 110–129 °С, 25–30 мин, давление 1 атм, условия биоконверсии: pH 6,0–6,5, температура 25–28 °С, количество посевного материала 3–4 %).

Токсикологические исследования разработанного микробного кормового продукта на крысах линии «Wistar» показали их безопасность. Их биологическая безопасность и кормовая ценность также доказана путем кормления ими цыплят-бройлеров кросса «Росс 308» в НВЦ «Новые биотехнологии». Апробированы технологические процессы получения БК в ООО «Биопрогресс» – ВНИТИ биологической промышленности» и культивирования штаммов дрожжей родов *Saccharomyces cerevisiae* 121 и *Geotrichum candidum* 977 на вторичных продуктах переработки муки в ЦКП «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Разработана нормативная документация (ТИ, ТУ на пищевой белковый концентрат и кормовые дрожжи), рецептура нового кисломолочного продукта с гороховым белковым концентратом и рецепт комбикорма для кур-бройлеров с кормовыми дрожжами.

Проведена оценка экономической эффективности комплексной переработки гороховой муки на белковый концентрат и кормовые дрожжи. Получен патент «Способ получения кормового концентрата» RU № 2791226 от 06.03.2023 г. Проведены совместные испытания с ООО «Уралхим Инновация» для отработки их технологии получения белковых концентратов с определением функциональных свойств и состава.

Личный вклад автора подробно описан в автореферате и введении.

Структура и объем диссертационной работы

На рассмотрение представлена диссертация, состоящая из введения, трех глав экспериментальной части, включающей аналитический обзор литературных источников, методологическую часть, описание результатов собственных исследований и их обсуждение, заключения, списка

использованных источников литературы и приложений. Основной текст работы изложен на 136 страницах, он включает в себя 40 таблиц и 31 рисунок, 8 приложений на 22 страницах, списка цитируемой литературы из 253 наименований.

Диссертационная работа содержит достаточное количество полученных данных, имеет пояснения, графические и табличные материалы. По каждой главе и работе в целом имеются выводы.

Оценка содержания диссертации, степень обоснованности и достоверности результатов исследований

Структура диссертации логически построена, характеризуется последовательностью изложения материала, обоснованностью и логичностью выводов.

Достоверность результатов подтверждена успешной апробацией в опытно-экспериментальных условиях предприятий ООО «Биопрогресс» и ЦКП ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Текст диссертации проиллюстрирован рисунками и таблицами, отражающими все полученные результаты в процессе работы.

Решены все поставленные задачи при выполнении диссертационной работы, что дает право считать её законченным научным трудом.

По результатам исследований опубликована 31 научная работа, 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 международных конференций.

Введение содержит обоснование актуальности исследования. Сформулированную цель и задачи исследований. В разделе изложены научная новизна и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту.

В 1 главе экспериментальной части приведены результаты анализа научно-технической информации, описывающие состояние вопроса.

Проанализирован рынок производства зернобобовых культур в Российской Федерации. 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. Рассмотрены экологические аспекты в части микробиологической трансформации вторичных продуктов переработки

растительного сырья в кормовые белковые продукты.

Обзор литературных данных показал актуальность и перспективность исследования и на основании анализа сформулированы цель и задачи работы.

Во 2 главе описаны объекты исследования, изложена методология и организация научных исследований. Подробно приведены сведения об используемых методах анализа, в частности, определение: массовой доли белка методами Кьельдаля, Барнштейна, Лоури, углеводного и аминокислотного составов хроматографическими методами, молекулярных масс белков методом гель-электрофореза в SDS-ПААГ; перевариваемости, активности уреазы белковых концентратов и кормовых дрожжей; макро- и микроэлементов - методом пламенной абсорбции; жирнокислотного состава кормовых дрожжей, фракционного состава белков муки, влияние ультразвуковой обработки, аминокислотного сора белков концентратов и дрожжей, вторичной структуры белков методом кругового дихроизма и т.д.

В 3 главе описаны основные результаты проведенных исследований и логически построено их обсуждение.

Обосновано использование нативной гороховой муки, что благоприятно для получения белкового концентрата без применения щелочей. Доказана возможность перевода белков в водный раствор с ферментными препаратами и повышения выхода белков при осаждении в изoeлектрической точке с применением лактата кальция и транsgлутаминазы. Пищевые белковые концентраты содержали 74,4–86,1 % на СВ белков с аминокислотным скором 109–212 %, минеральные вещества (железо, кальций и др.), липиды, углеводы. Перевариваемость концентратов *in vitro* выше в 1,5–1,7 раза, чем у яичного альбумина. Активность уреазы – 0–0,01 ед рН. В концентратах отсутствовали гороховый запах и привкус.

Разработан процесс кислотного гидролиза нерастворимого крахмал-белкового остатка и биоконверсия его с сывороткой в кормовой белковый продукт на основе ассоциации культур *S. cerevisiae* и *G. candidum* 977. Продукт содержал 51,1–61,7 % белка на СВ, 2–8 % липидов, 8–9 % золы. Аминокислотный скор – 90–247 %, соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот 1:3, омега-6 жирные кислоты – 19,7 %, 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 %, активность уреазы 0,02–0,03 ед. рН.

Разработан способ приготовления кисломолочного продукта с гороховым белковым концентратом. Продукт обогащен белком, кальцием,

калием, цинком, медью, железом и может быть рекомендован лицам с ослабленным здоровьем и анемией. Создан рецепт комбикорма для цыплят-бройлеров с кормовыми дрожжами взамен соевого шрота. Данная замена повышала привес бройлеров (на 5,53 %) и качественные показатели мяса. Соотношение жир:белок в нем снизилось на 20,8 %. Разработаны нормативные документы: «Технологическая инструкция по производству концентрата белкового горохового пищевого и дрожжей кормовых из зернобобового сырья» – ТИ 00334735-129-2022; Технические условия «Концентрат белковый гороховый пищевой» – ТУ 10.89.19-166-00334735-2022; Технические условия «Дрожжи кормовые из зернобобового сырья» – ТУ 10.91.10-167-00334735-2022. Произведен ориентировочный расчет экономического эффекта производства полученных продуктов. Себестоимость концентрата – 850 руб./кг, дрожжей – 58,3 руб./кг, чистая прибыль – 211,73 тыс. руб., рентабельность – 22,9 %.

Таким образом, основные положения диссертации подтверждены результатами и получили развернутое и содержательное обоснование в тексте диссертации.

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

Выводы диссертационной работы представляют собой логическое завершение проведенных исследований и вытекают из представленных экспериментальных материалов.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат изложен на 24 страницах, включает 2 таблицы, 6 рисунков и содержит сведения о 31 работе, опубликованной по материалам диссертации. Материалы автореферата в полном объеме отражают основное содержание диссертации.

Вопросы и замечания по содержанию и оформлению работы

По результатам анализа диссертационной работы Д.С. Куликова выявлены следующие замечания и вопросы:

1. При исследовании влияния карбогидраз на растворимость белков использована матрица планирования эксперимента, однако в материалах и методах не показана методология математической обработки результатов.

2. В описании ферментных препаратов не указана их область действия (рН и температура). Определяли ли оптимальные условия действия ферментных препаратов для использованного субстрата?

3. При описании ультразвуковой обработки не показано какая частота ультразвука была использована. Каким образом планируется масштабирование ультразвуковой обработки в промышленных масштабах?

4. Для получения сухих кормовых дрожжей выбран достаточно энергозатратный способ лиофильного высушивания. Чем обоснован такой выбор?

5. При разработке способа получения и рецептуры кисломолочного продукта с гороховым белковым концентратом типа йогурт не указана методика, по которой проводилась органолептическая оценка и исследуемые сенсорные показатели качества.

6. В качестве пожелания хотелось бы предложить рассмотреть возможность получения пищевых или кормовых добавок из вторичных продуктов переработки гороховой муки с пробиотическими свойствами, например за счет использования штаммов бифидо- и лактобактерий.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научную ценность и практическую значимость диссертационной работы. Представленные к защите результаты могут быть рекомендованы к использованию ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет», ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и других исследовательских и образовательных организациях.

Заключение

Анализ материалов исследований и выводов дает основание полагать, что диссертационная работа Куликова Дениса Сергеевича является законченным, самостоятельным научным исследованием.

По актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Куликова Д.С. на тему «Комплексная биотехнологическая переработка гороховой муки с получением белковых концентратов» соответствует требованиям положения ВАК Министерства образования и науки РФ о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением

Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, а её автор Куликов Денис Сергеевич заслуживает присвоения ученой степени кандидата технических наук по специальности 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ».


Отзыв составлен доктором технических наук, профессором, заведующим кафедрой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Панфиловым Виктором Ивановичем. Отзыв рассмотрен и единогласно одобрен на заседании кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева 07.11.2023 г., протокол № 3.

д.т.н., профессор
заведующий кафедрой биотехнологии
РХТУ им. Д.И. Менделеева


В.И. Панфилов

Подпись В.И. Панфилова удостоверяю.
Ученый секретарь Ученого совета
РХТУ им. Д.И. Менделеева
д.т.н., профессор




Н.А. Макаров
13 НОЯ 2023 2023 г.

Контактные данные:
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Российский химико-
технологический университет имени Д.И.
Менделеева»
(РХТУ им. Д.И. Менделеева)
125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9
Тел. +7 (495) 495-23-79,
e-mail: panfilov.v.i@muctr.ru
Web-сайт: <https://www.muctr.ru>