

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Волчок Анастасии Александровны на тему «Новые мультиферментные комплексы для деструкции полисахаридов плодового сырья в условиях винодельческого производства», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Совершенствование биотехнологических процессов с целью повышения выхода и качества целевого продукта является важной задачей современной промышленности. В этом отношении диссертационная работа А.А. Волчок, посвященная разработке, исследованию и выявлению возможности практического применения новой группы мультиферментных препаратов, предназначенных для использования в винодельческом производстве, является вполне актуальной.

Несмотря на то, что виноделие является одной из основных отраслей пищевой биотехнологии, используемой в течение многих столетий, отдельные стадии этого достаточно сложного процесса могут быть усовершенствованы, что дает возможность повысить экономическую составляющую этого производства.

Как известно, производство винодельческой продукции является многостадийным технологическим процессом, включающим в себя помимо выращивания культур с оптимальными характеристиками, также целый ряд стадий обработки исходного сырья. В настоящее время одной из таких стадий является использование ферментных препаратов (ФП), позволяющее реализовать более глубокую переработку сырья, повысить таким образом выход целевого продукта и улучшить качество последнего.

Такие ФП выпускаются в ряде стран и являются коммерческими продуктами, находящимися на рынке. Тем не менее, улучшение эффективности ФП, предназначенных для использования в виноделии, продолжает оставаться важной теоретической и технологической задачей, решению которой и посвящена рецензируемая диссертация.

Диссертационная работа А.А. Волчок построена традиционно и включает введение, две главы обзора литературы, главу, в которой описаны использованные материалы и методы, пять глав, рассматривающих полученные результаты и их обсуждение, заключение, список цитируемой литературы (169 ссылок) и приложение. Работа изложена на 138 страницах, включает 43 рисунка и 25 таблиц.

Во **введении** (с.5-8) диссертант аргументированно освещает актуальность темы исследования, поставленную задачу работы, ее новизну и практическую значимость, достоверность полученных результатов, положения, выносимые на защиту, а также приводит данные о публикации результатов исследования и их апробации.

В **обзоре литературы**, изложенном в двух главах, диссертант достаточно компактно рассмотрела технологические аспекты производства фруктовых и виноградных вин (**Глава 1** – с.9-16) и особенности использования ферментных препаратов при первичной переработке плодов и ягод на примере винодельческой отрасли (**Глава 2** – с. 17-35). Несмотря на краткость изложения, обзор литературы вполне аргументированно обосновывает выбранное направление работы. Существенно, что в обзоре четко отмечены

проблемы, связанные с получением высококачественных продуктов, решаемые с использованием ферментных систем.

Важно, что сопровождающий обзор список литературы содержит преимущественно источники, опубликованные в отечественной и зарубежной литературе за последние 10-15 лет.

В главе 3 (с. 36-54) рассмотрены материалы и методы эксперимента и исследования, использованные в работе. Следует отметить чрезвычайно широкий круг примененных в работе вполне современных биохимических методов, касающихся получения разработанных ФП, определения их состава, особенностей их применения для обработки различного виноматериала, использованных в работе физико-химических методов исследования, а также медико-биологических методов, в том числе связанных с работой с подопытными животными. Обращает на себя внимание тщательность описания методик исследования и их выбор, позволяющий полно решить задачу диссертационной работы.

Высокий уровень экспериментальных исследований и использование статистической обработки полученных результатов подтверждают **достоверность приведенных в диссертации результатов.**

В главе 4 (с. 55-61) рассмотрены методики получения разрабатываемых ФП как продуктов жизнедеятельности штаммов гриба *Penicillium verruculosum* РВ4 и РВ7, выбранных для исследования, так как состав получаемых на их основе ФП отвечал требованиям эффективной биоконверсии компонентов растительной стенки плодов, основными составляющими которой являются целлюлоза, гемицеллюлозы и пектин. В качестве штаммов сравнения был использован ряд коммерческих ФП группы «Тренолин».

В ходе работы по получению разрабатываемых штаммов диссертант использовала достаточно объемную аппаратуру (ферментер на 10 л), позволяющую продуцировать целевые ФП на полупромышленном уровне, пригодном для дальнейшего масштабирования.

Полученные и коммерческие ФП были охарактеризованы по содержанию белков с различной ферментативной активностью, относящихся к группе гидролаз. Методом электрофореза были определены молекулярные массы отдельных ферментов, входящих в состав ФП.

В главе 5 (с.62-81) диссертант рассмотрела результаты гидролиза различных видов растительного сырья с использованием разработанных и коммерческих ФП.

При этом в работе были рассмотрены три группы субстратов – сырье на основе ягод плодовых растений (рябины, сливы, черной смородины), ягод винограда (сорта «Цимлянский черный», «Каберне Совиньон», «Изабелла», «Ркацител»), а также сброженных виноградных выжимок, как дополнительного сырья при получении функциональных продуктов из отходов винодельческого производства (рассмотрено в главе 7 – с. 98—104).

Как было показано, при использовании разработанных ФП при обработке плодового сырья по сравнению с контрольными образцами наблюдались увеличение выхода сока и содержания в гидролизатах глюкозы и восстанавливающих сахаров (содержащих карбонильную группу) на 10-20 %.

В результате ферментативной обработки разработанными ФП сырья из технических сортов винограда выход сусле превышал результаты, получаемые при использовании коммерческих препаратов, и достигал 40 % (на 10-12 % выше, чем в случае коммерческих препаратов) при некотором увеличении количества сахара в сусле. А удельная пектинлиазная активность лучших разработанных препаратов превосходила максимальную активность коммерческих препаратов в 2,3 раза.

Обработка разработанными ФП сброженных виноградных выжимок (глава 7) дала возможность получать экстракты, обогащенные глюкозой и галловой кислотой, которая может быть использована при синтезе ряда красителей и косметических продуктов.

Все вышеизложенное показывает высокий уровень научной новизны полученных результатов.

Глава 6 (с. 82-97) диссертации посвящена исследованию характеристик фруктовых и виноградных вин при использовании разработанных ФП. При этом в качестве основного ФП был применен препарат, кодированный как ФП ВІ 7.7, показавший лучшие результаты в предыдущих исследованиях.

Как было показано в органолептических тестах, использование разработанных ФП позволяет получить продукцию виноградного и фруктового виноделия с высокими качествами.

Поскольку разработанные ФП являются продуцентами культур микроскопических грибов, их состав, а также состав получаемой продукции был исследован на наличие микотоксинов – афлатоксинов и охратоксинов (Глава 8 – с. 105-116). Кроме того, был определен уровень токсичности препарата ФП ВІ 7.7 при пероральном его введении и наличие острой аллергической реакции и сенсибилизирующий эффект на воздействие ФП. Исследования были проведены на крысах линий Wistar и Norway Brown.

Было найдено, что значения  $LD_{50}$  превышали 5000 мг/кг веса. При этом отличия массы тела и размера различных органов опытных животных по сравнению с контрольной группой не было отмечено.

При определении содержания микотоксинов в образцах вин, изготовленных с использованием ФП ВІ 7.7, было показано, что содержание охратоксина А в пробах вина не различимо, в то время как афлатоксины содержатся в образцах красных вин в следовых количествах (близки к пределу обнаружения либо немного ниже предела обнаружения).

Исследование острой реакции на накожное нанесение ФП показало отсутствие типичных аллергических признаков (отек кожи, некроз, инфильтрация).

Наконец, было установлено, что сенсибилизирующее действие ФП после внутрижелудочной разрешающей дозы не было обнаружено через 42 дня, что было подтверждено исследованием содержания форменных элементов крови и гистологических исследований эпителия тонкого кишечника по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, разработанный новый ФП является более эффективным, чем товарные образцы, не обладает токсичностью и может быть рекомендован для

использования в технологии фруктовых и виноградных вин, что подтверждает **практическую значимость** рецензируемой работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 9 публикациях, в том числе 5 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 3 тезисах и 1 статье в сборнике материалов конференций.

Работа является весьма объемным исследованием и производит хорошее впечатление. Она хорошо оформлена, в основном не содержит опечаток.

По работе можно сделать ряд замечаний:

1. Не ясно, почему в качестве продуцента целевых ФП была использована именно культура *Penicillium verruculosum*. Хотя отмечается, что данная культура позволяет получать ФП с нужным комплексом ферментов, но все-таки не ясно, это единственная такая культура, или могут быть более эффективные культуры.

2. Хорошо бы в обзоре литературы привести классификацию подходов к обработке виноматериалов, например – химические, ферментативные, физические, сорбционные, мембранное разделение и т.д.

3. Не ясно, как вычислялось количество субстрата при ферментативной обработке. Сказано (с. 42-43), что отбиралось определенное количество (20 мл) пробы, содержащей плодое или виноградное пюре и другие компоненты. Но не отмечено, сколько содержалось в пробе субстрата в пересчете на сухое вещество, т.к. нет гарантии, что, например, содержание воды во всех пробах и для всех видов исходного сырья было одинаково. В таблицах количество ФП дозировано в % от массы субстрата – какой массы сухого вещества или количества пюре в мл?

4. В некоторых случаях в недостаточной степени описаны используемые материалы, например, не ясно, какую молекулярную массу и какую степень замещения имела использовавшаяся в составе полимерных субстратов карбоксиметилцеллюлоза, поскольку эти показатели играют важную роль в реакционной способности полимеров, в том числе их отношении к биодеструкции (с. 38 диссертации). То же относится к высокометилированному пектину, полигалактуроновой кислоте и другим полимерным субстратам.

5. Имеется ряд частных замечаний:

- Никакой необходимости не было в использовании такого большого списка сокращений. Тем более, что некоторые из сокращаемых понятий используются в тексте достаточно редко.

- В работе имеется ряд неудачных выражений или терминов, например – мешальники (с. 43 диссертации).

Однако указанные замечания ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления, сложившегося при анализе диссертационной работы А.А. Волчок.

Характеризуя работу в целом, можно отметить, что диссертация А.А. Волчок является завершенной научно-квалификационной работой, обладающей внутренним единством, в которой, на основании выполненных систематических исследований разработаны теоретические положения о закономерностях воздействия новых

ферментных препаратов на плодово-ягодное и виноградное сырье и показана возможность практического применения полученных данных.

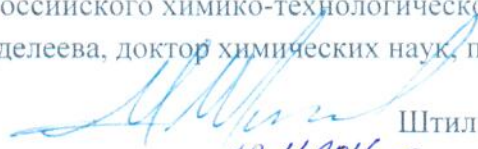
Работа соответствует паспорту специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в части «Области исследования» п.1, 2, 3, 4, 7.

Таким образом, по критериям актуальности, научной новизны и практической значимости представленная к защите диссертация «Новые мультиферментные комплексы для деструкции полисахаридов плодового сырья в условиях винодельческого производства» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 Постановления Правительства РФ № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Волчок Анастасия Александровна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

Официальный оппонент:

Руководитель Учебно-научного центра «Биоматериалы»  
ФГБОУ ВО Российского химико-технологического университета  
им. Д.И. Менделеева, доктор химических наук, профессор



Штильман Михаил Исаакович

18.11.2016 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»  
Адрес: 125047, г. Москва, Миусская площадь, д.9  
Телефон: 8-910-409-04-37. e-mail: shtilmanm@yandex.ru

Подпись профессора М.И. Штильмана  
удостоверяю  
Ученый секретарь РХТУ им. Д.И. Менделеева  
профессор



Т.В. Гусева