

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Горбункова Михаила Владимировича

**«Физико-химические свойства протеолитического комплекса и
применение ферментного препарата «Протепсин» для обработки
сырья животного происхождения»,**

представленную на соискание учёной степени

кандидата технических наук

**по специальностям: 05.18.07 – «Биотехнология пищевых продуктов и
биологических активных веществ» и 05.18.04 – «Технология мясных,
молочных и рыбных продуктов и холодильных производств»**

Диссертация посвящена изучению физико-химических свойств протеолитического комплекса ферментного препарата «Протепсин» и возможности его применения для обработки сырья животного происхождения.

Современные технологии производства мясных продуктов должны основываться на принципах ресурсосберегающих технологий, расширяя ассортимент продуктов питания за счет рационального использования сырьевых ресурсов. Немаловажное значение при этом имеет поиск и применение добавок, позволяющих создавать такие продукты питания.

Актуальность работы обусловлена мировыми тенденциями в области производства и использования ферментных технологий и задачами, которые ставит перед наукой Правительство РФ в «Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года». Создание и внедрение инновационных технологий позволило в значительной степени расширить сферу применения ферментных препаратов. Для реализации этих задач необходимо создавать и внедрять технологии, которые помогают улучшить качество продукции, повысить ее безопасность, увеличить

эффективность технологических процессов, сократить производственные издержки и снизить антропогенное воздействие на окружающую среду.

Развитие научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ в области ферментных препаратов является не только достаточно привлекательной с точки зрения науки, но и важной государственной задачей импортозамещения, которая обозначена в Послании Президента РФ В.В. Путина Федеральному Собранию РФ в 2015 году.

Особое значение имеют протеолитические ферментные препараты, именно они составляют самый крупный сегмент мирового рынка ферментов, и именно с их использованием осуществляется поиск новых источников и форм белковой пищи.

В связи с этим исследование, направленное на изучение физико-химических свойств протеолитического комплекса и разработку технологий применения ферментного препарата «Протепсин» для обработки сырья животного происхождения, является актуальным.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна. Анализ структуры и содержания работы

Представленная на оппонирование диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 153 наименований источников, в том числе 38 иностранных. Работа изложена на 168 страницах машинописного текста, включает 12 таблиц, 34 рисунка и 2 приложения.

Работа соискателя основана на критическом анализе состояния вопроса, результаты которого изложены в главе 1. В научном обзоре рассмотрены современные тенденции мясного рынка, показан опыт производства ферментов, создания и распространения ферментных технологий, перспективам их применения в реальных секторах экономики, значению в увеличении ресурсного потенциала пищевых продуктов животного происхождения, интенсификации технологических процессов.

Анализ трудов отечественных и зарубежных ученых в области использования ферментных технологий для увеличения сырьевого потенциала, экономного расходования сырья, разработки новых ассортиментных линеек оригинальных и нетрадиционных продуктов питания, обеспечивающих физиологические потребности человека, позволил соискателю сформулировать цель и задачи работы, обосновать выбор основных объектов и методов исследований.

Поставленные задачи были решены с использованием стандартных методов исследований позволяющие получить комплексную информацию о свойствах ферментного препарата, его действии на мясные и молочные системы, возможностях использования ферментных технологий для увеличения ресурсного потенциала мясного и молочного производства пищевых продуктов, в том числе: протеолитическую активность – методом Ансона, молокосвертывающую – методом ВНИИМС, пептидазную активность по методу Мура и Стейна, общий белок – фотометрически и методом Кьельдаля, фракционный состав продуктов гидролиза казеина – методом ступенчатого осаждения; аминокислотный состав белков – хроматографически на аминоксизаторе ААА – 881, фракционный состав растворимых белков – последовательным осаждением растворами солей, щелочей и дистиллированной водой; фракционирование и идентификацию протеолитических ферментов – электрофорезом на ДЭАЭ – целлюлозе, фильтрацией на сефадексе G – 100; микроструктуру – по ГОСТ Р50372-92; перевариваемость *in vitro* – методом Покровского-Етранова; функционально технологических свойств – по методам, описанным в книге Л.В. Антиповой (2004); цветовые характеристики – спектрофотометрически; показатели качества готовых изделий – в соответствии с действующей технической документацией.

Математическая обработка экспериментальных данных и их графическое представление выполнены с помощью стандартных методов и с

использованием программ Microsoft Excel, Statistica. Все это позволило получить достоверные результаты работы.

Целью первого этапа работы стало исследование по идентификации протеолитических фракций в составе комплекса ферментов электрофоретическими и хроматографическими методами, в том числе обладающих молокосвертывающей активностью.

Установлено, что белковый комплекс препарата представлен четырьмя белковыми фракциями, отличающимися подвижностью в среде ПААГ. Идентификация протеолитических ферментов в геле и экстрагированием из геля показала, что в составе белков препарата имеется две протеолитические фракции.

В ходе экспериментальных исследований показано, что общая протеолитическая активность (ПА) сосредоточена в 2-х фракциях. На рисунке 2 видно, что молокосвертывающей активностью обладает лишь один фермент протеолитического комплекса.

Проведенный соискателем анализ результатов экспериментов показал, что протеиназы I и II активны и стабильны в кислой области pH при температурах, характерных для животных организмов, достоверно отличаются pH- и температурными оптимумами действия (соответственно 4,0 и 45°C, 4,5 и 40°C). Ферменты различаются числом остатков различных аминокислот в первичной структуре, где суммарно определяется около 50% гидрофобных аминокислот, количественно преобладают глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, что соответственно объясняет роль гидрофобных взаимодействий в стабилизации пространственной структуры и активность в области кислых значений pH.

Научный интерес представляют данные гистоморфологических исследований, которые доказывают, что протеолитические ферменты, действуют на мясные субстраты с различным содержанием соединительной ткани, что приводит к стимулированию функционально-технологических свойств низкосортного сырья, продуктов разделки и обработки туш,

увеличению атакуемости мясных белков ферментами желудочно-кишечного тракта, ускорению процессов созревания при сохранении цветности и удовлетворяют микробиологическим требованиям.

Второй этап исследований был посвящен изучению влияния препарата «Протепсин» на свойства мясного и молочного сырья.

Методами микроструктурного анализа подтверждено действие препарата на морфологические структуры ткани, в том числе на соединительнотканые. Установлено, что ферментный препарат «Протепсин» усиливает действие лизосомных ферментов, что позволяет закончить посол и созревание за 6-8 часов, что в 1,8-2,5 раза быстрее, чем при традиционном посоле.

В опытах на цельномышечных и фаршевых мясных системах показана одинаковая тенденция к увеличению функционально-технологических свойств, независимо от доли соединительных включений.

Эти данные в целом согласуются с результатами, полученными ранее другими исследователями.

К новым результатам следует отнести данные о влиянии исследование действия препарата «Протепсин» на белки молока в сравнении в сравнении сычужным ферментом применительно к технологии сыров.

В работе экспериментально доказано, что препарат «Протепсин» обладает молокосвертывающей активностью и способен гидролизовать казеина молока и белки молочной сыворотки.

Расчет активных масс, обеспечивающих время свертывания молока за 10 минут при рН 5,5 и 6,5 и температуре 35°C показал, что «Протепсин» в 3,7 раза активнее разлагает казеин молока при рН 6,5 и в 4,1 раза при рН 5,5. Оценка суммарных продуктов гидролиза казеина свидетельствует о более широкой субстратной специфичности препарата «Протепсин», так как гидролизаты обогащены пептидами и аминокислотами. Следует отметить, что в гидролизатах обоих препаратов преобладают фенилаланин, валин,

глутаминовая кислота, что указывает на некоторую их общность в механизме разрыва пептидных связей.

Научные результаты, апробация, внедрение препарата «Протепсин» в реальном производстве позволили автору сформировать основные направления функциональных ферментных технологий.

Таким образом, **новизна** представленной на оппонирование работы заключается в том, что впервые получены данные о фракционном составе протеолитического комплекса препарата «Протепсин», методами электрофореза и хроматографии идентифицировано два протеолитических фермента, отличающиеся физико-химическими и биохимическими свойствами. Электрофоретически и хроматографически доказано, что ферменты отличаются подвижностью в электрическом поле, величиной поверхностного заряда, молекулярной массой.

Новыми являются результаты исследования функциональных групп каталитического центра и специфичность их действия при гидролизе белков и пептидов, которые обосновывают рациональные пути привлечения малоиспользуемого мясного и молочного сырья для увеличения ресурсного потенциала пищевых продуктов и интенсификации технологических процессов.

Научный и практический интерес представляют полученные аспирантом данные о влиянии препарата «Протепсин» на мясные и молочные белки, доказано, что данный препарат гидролизует мышечные и соединительнотканые белки. Руководствуясь этим, автор в своей работе предлагает использовать препарат «Протепсин» как в мясной, так и молочной промышленности для создания конкурентоспособных продуктов.

Результаты промышленных апробаций указывают на перспективность данного направления и необходимость детализированных исследований в данном направлении в перспективе.

Следует отметить, что новизна подтверждена заявками на патенты РФ (заявка №201514756/13(073256); №2015147566/13(073255)), и их значимость

– результатами апробаций и внедрением в реальное производство с доказательством экономической целесообразности.

Практическая значимость работы обусловлена тем, что соискателем обоснованы, апробированы и рекомендованы ферментные технологии обработки сырья животного происхождения для увеличения ресурсного потенциала пищевых продуктов за счет вовлечения в рецептурные решения мясного сырья с высокой массовой долей соединительнотканых включений (10-100%). Сформированы подходы к выбору объектов для внедрения ферментных технологий, разработаны условия, параметры и режимы реализации частных технологий.

Разработана технологическая инструкция по применению ферментного препарата «Протеписин» фирмы «Прайм плюс ингредиенты» для производства мясопродуктов.

Публикация основных результатов диссертации

Основные положения работы и результаты исследований доложены соискателем на международных, всероссийских, внутривузовских научных конференциях. По результатам исследований опубликовано 13 печатных работ, в то числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, заявок на патенты РФ – 2.

Результаты отмечены сертификатами участника, дипломами и медалями выставочных центров.

Соответствие автореферата основным положениям

Автореферат отражает содержание диссертации и оформлен в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ.

В процессе изучения материалов диссертации возникли следующие вопросы и замечания по работе.

1. Для объективной оценки нового фактического материала, полученного в ходе исследований, целесообразно было бы представить сравнительный

анализ влияния протепсина с другими ферментными препаратами, в частности с папаином.

2. Не понятно, каким образом была определена субстратная специфичность влияния препарата «Протепсин» на стандартные и нестандартные белковые системы?
3. В работе было идентифицировано 2 фермента в составе протеолитического комплекса препарата «Протепсин» (протеиназа I и II), поясните почему для дальнейшей обработки сырья животного происхождения применяют только весь препарат?
4. На наш взгляд в автореферате следовало бы представить краткое описание технологических решений производства пищевых продуктов с использованием препарата «Протепсин».
5. Поясните, на чем основывается выбор сырья при изучении изменения атакуемости гидролизованных белков мяса говядины I и II сорта под действием ферментных препаратов пищеварительного тракта в опытах *in vitro*?
6. Встречаются опечатки и неточности в диссертационной работе, а именно: с. 6, 10, 26, 33, 36, 42, 69, 100, 106, рис. 4.5, 4.7 на стр. 110 и в поз. №44 списка литературы.

Данные замечания не снижают научную и практическую значимость выполненных соискателем исследований.

Диссертация Горбункова Михаила Владимировича «Физико-химические свойства протеолитического комплекса и применение ферментного препарата «Протепсин» для обработки сырья животного происхождения» является законченной, самостоятельно выполненной научно-исследовательской работой, содержащей научно обоснованную технологическую разработку, которая вносит вклад в решение задачи увеличения сырьевого потенциала, экономного расходования сырья, разработки новых ассортиментных линеек оригинальных и нетрадиционных

продуктов питания, обеспечивающих физиологические потребности человека и имеет существенное значение для развития ферментных технологий.

На основании вышеизложенного считаю, что по актуальности, научной и практической ценности, новизне, достоверности результатов и обоснованности выводов рассмотренная диссертационная работа отвечает критериям «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям ВАК Минобрнауки РФ, а ее автор Горбунков Михаил Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальностям: 05.18.07 – «Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ» и 05.18.04 – «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств».

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой «Технологии мяса и консервирования»
ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет»,
к.т.н. по научной специальности 05.18.04 – Технология мясных,
молочных и рыбных продуктов и холодильных
производств, доцент

Оботурова Наталья Павловна

09.06.2016 г

355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1,
+79614700778, noboturova@gmail.com



ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
начальник управления
Кадровой политики СКФУ
ГРЕЧУХО Е. В.

Верно:

Должность лица, заверяющего представленную информацию